

Aus dem Institut für Virologie der Philipps-Universität Marburg

Direktor: Prof. Dr. Stephan Becker

Die Rolle des aviären PB1 Gens bei der Entstehung pandemischer Influenza-A-Viren



Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Isabel Wendel

aus Erbach im Odenwald

Marburg an der Lahn

2014

Vom Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg
als Dissertation angenommen am:

Erstgutachter: Prof. Dr. Erhard Bremer
Zweitgutachter: Prof. Dr. Hans-Dieter Klenk

Weitere Mitglieder der Prüfungskommission:
Prof. Dr. Wolfgang Buckel
Prof. Dr. Susanne Önel

Tag der mündlichen Prüfung:

Hochschulkennziffer: 1180

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung

Summary

I. Einleitung.....	1
I.1 Molekularbiologie des Influenza-A-Virus.....	1
I.1.1 Taxonomie.....	1
I.1.2 Morphologie.....	2
I.1.3 Genomaufbau.....	4
I.1.4 Replikationszyklus.....	6
I.2 Pathogenese.....	9
I.2.1 Klinik und Pathogenese beim Menschen.....	9
I.2.2 Therapie und Prophylaxe.....	10
I.3 Evolution, Ökologie und Epidemiologie des Influenza-A-Virus.....	12
I.3.1 Aviäre Influenza.....	12
I.3.2 Humane Influenza.....	13
I.3.3 Wirtsspektrum der Influenza-A-Viren und ihre Übertragung zwischen den Spezies.....	14
I.3.4 Virale Determinanten des Wirtsspektrums.....	15
I.3.5 Entstehung von Influenza-Pandemien.....	18
I.3.6 Influenza-Pandemien des 20./21. Jahrhunderts.....	20
I.4 Das PB1 (p olymerase b asic 1) Gen und seine Genprodukte.....	24
I.4.1 Genomischer Aufbau des PB1-Gensegments.....	24
I.4.2 Struktur und Funktion des PB1-Proteins.....	26
I.4.3 PB1-F2.....	29
I.4.4 PB1-N40.....	31
I.4.5 Einfluss des PB1-Gensegments auf die Pathogenität und Virulenz von Influenza-A-Viren.....	31
I.4.6 Einfluss des PB1-Gensegments auf das Wirtsspektrum der Influenza-Viren..	32
I.4.7 Die Rolle des PB1-Gensegments bei der Entstehung von Influenza-Pandemien.....	34
I.5 Fragestellung und Zielsetzung.....	38

II. Material.....	40
II.1 Chemikalien.....	40
II.2 Verbrauchsmaterial.....	41
II.3 Kommerziell erhältliche Reaktionsansätze.....	42
II.4 Laborgeräte.....	42
II.5 Puffer und Lösungen.....	43
II.5.1 Puffer.....	43
II.5.2 Lösungen.....	44
II.6 Nukleinsäuren und Nukleotide.....	44
II.6.1 Nukleinsäuren als Größenmarker.....	44
II.6.2 Nukleotide.....	45
II.6.3 DNA-Oligonukleotide.....	45
II.7 Vektoren und rekombinante Plasmide.....	47
II.8 Enzyme.....	48
II.9 Antikörper.....	49
II.10 Kultur prokaryotischer Zellen.....	49
II.11 Kultur eukaryotischer Zellen.....	49
II.12 Virusstämme.....	51
 III. Methoden.....	 52
III.1 Molekularbiologische Methoden.....	52
III.1.1 Herstellung und Transformation kompetenter <i>Escherichia coli</i> -Bakterien...	52
III.1.2 Herstellung von Bakterien-Kryostocks.....	53
III.1.3 Präparation von Plasmid-DNA aus <i>Escherichia coli</i> -Bakterien.....	53
III.1.4 Spektralphotometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren...	53
III.1.5 Fällung von DNA.....	54
III.1.6 Restriktionsverdau von doppelsträngiger DNA.....	54
III.1.7 Dephosphorylierung von DNA.....	55
III.1.8 Ligation.....	55
III.1.9 Amplifikation von DNA durch die Polymerasekettenreaktion (PCR).....	55
III.1.10 Elektrophoretische Auftrennung von DNA im Agarosegel.....	57
III.1.11 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	57
III.1.12 Aufreinigung von DNA-Fragmenten und PCR Produkten.....	57
III.1.13 Sequenzierung von DNA.....	58
III.1.14 Zielgerichtete Mutagenese.....	58

III.1.15	Reverse Transkription-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR).....	60
III.1.15.1	Einstufige RT-PCR.....	60
III.1.15.2	Zweistufige RT-PCR.....	61
III.1.16	Bestimmung der Polymerase-Aktivität rekonstituierter vRNP-Komplexe....	63
III.1.16.1	Transfektion von Säugerzellen und Zelllyse.....	65
III.1.16.2	Bestimmung der Luziferase-Aktivität.....	65
III.1.17	Bestimmung der viralen Polymerase-Genauigkeit.....	66
III.1.18	Sequenzierung der nicht-kodierenden Regionen (NCRs) der viralen Gensegmente mittels 3'RACE und 5'RACE.....	68
III.2	Zellbiologische Methoden.....	69
III.2.1	Kultivierung eukaryotischer Zelllinien.....	69
III.2.2	Einfrieren und Auftauen eukaryotischer Zelllinien.....	70
III.2.3	Zellzahlbestimmung mit der Neubauer-Zählkammer.....	70
III.2.4	Beschichten von Zellkulturplatten.....	71
III.2.5	Transfektion.....	71
III.3	Virologische Methoden.....	72
III.3.1	Generierung rekombinanter Viren mittels reverser Genetik.....	72
III.3.1.1	Virus-Rescue.....	74
III.3.2	Plaque-Aufreinigung.....	75
III.3.3	Virusanzucht.....	76
III.3.3.1	Virusanzucht auf MDCK-Zellen.....	76
III.3.3.2	Virusanzucht im embryonierten Hühnerei.....	76
III.3.4	Reinigung und Ankonzentrierung von Viren.....	77
III.3.5	Genotypisierung von Viren.....	78
III.3.5.1	Isolierung viraler RNA.....	78
III.3.5.2	Sequenzierung viraler RNA.....	78
III.3.6	Bestimmung des Virustiters.....	78
III.3.6.1	Hämagglutinationstest (HA-Test).....	78
III.3.6.2	Bestimmung der infektiösen Viruspartikel (IP) mittels Einzyklischer Replikation.....	79
III.3.6.3	Bestimmung der Plaque-bildenden Viruspartikel mittels Plaque-Test.....	80
III.3.6.4	Immunhistochemische Färbung infizierter Zellen.....	81
III.3.7	Analyse des viralen Wachstumsverhaltens auf Calu-3-Zellen.....	82
III.3.8	Kompetitive Rescue-Experimente.....	82

III.3.9	Koinfektions-Experimente auf Calu-3-Zellen.....	83
III.4	Tierversuche.....	84
III.4.1	Narkose und Infektion von Dunkin-Hartley-Meerschweinchen.....	85
III.4.2	Bestimmung des viralen Wachstumsverhaltens und der Kontaktübertragungs-Effizienz in Meerschweinchen.....	85
III.4.3	Kompetitive Kontaktübertragungs-Studien in Meerschweinchen.....	86
III.4.4	Durchführung von Nasenspülungen bei Meerschweinchen.....	86
III.4.5	Euthanasie der Meerschweinchen.....	87
III.4.6	Titration und Genotypisierung der Nasenspülungen.....	87
III.5	Statistik.....	87
III.6	Phylogenetische Stammbaumanalyse.....	88
IV.	Ergebnisse.....	90
IV.1	Phylogenetische Identifikation des humanen A/California/1/66 (H2N2) Virus als humanes Ersatz-Vorläufervirus des pandemischen A/Hong Kong/1/68 (H3N2) Virus.....	90
IV.2	Generierung rekombinanter Influenza-A-Viren mittels reverser Genetik.....	94
IV.2.1	Etablierung des reversen Genetiksystems für A/California/1/66 (H2N2).....	94
IV.2.2	Generierung der rekombinanten Cal66-Viruspaare PB1 und HA+PB1.....	95
IV.2.3	Generierung des rekombinanten Viruspaares HK68.....	97
IV.3	Einfluss des aviären PB1-Gens auf die virale Replikationseffizienz in humanen Lungenkarzinom-Epithelzellen (Calu-3 Zellen).....	98
IV.3.1	Wachstumsverhalten der Viruspaare PB1, HA+PB1 und rHK68.....	98
IV.3.2	Charakterisierung der in den kompetitiven Replikations-Experimenten erhaltenen Virusmischungen.....	99
IV.3.3	Koinfektions-Studien mit den Viruspaaren PB1 und HA+PB1.....	102
IV.3.4	Kompetitive Rescue-Experimente mit den Viruspaaren PB1 und HA+PB1...	104
IV.4	Einfluss des aviären PB1-Gens auf die virale Übertragbarkeit in Meerschweinchen.....	106
IV.4.1	Kontaktübertragungs-Studien mit dem Viruspaar HA+PB1.....	106
IV.4.2	Kompetitive Kontaktübertragungs-Studien mit dem Viruspaar HA+PB1.....	107

IV.5	Sequenzierung der Nicht-kodierenden Regionen (NCR's) und ihr Einfluss auf die virale Replikationseffizienz.....	110
IV.5.1	Sequenzierung der Nicht-kodierenden Regionen (NCR's).....	111
IV.5.2	Einfluss der NCR's auf die virale Replikationseffizienz.....	113
IV.6	Rekonstruktion des nicht-adaptierten aviären PB1-Gens und sein Einfluss auf die virale Replikationseffizienz.....	116
IV.6.1	Rekonstruktion des nicht-adaptierten aviären PB1-Gens des aviären H3-Vorläufervirus mittels BLAST, phylogenetischer Stammbaum- und Sequenzanalyse.....	119
IV.6.2	Generierung nicht-adaptierter aviärer PB1-Plasmide.....	125
IV.6.3	Einfluss des nicht adaptierten aviären PB1-Gens auf die virale Replikationseffizienz.....	126
IV.7	Einfluss des aviären PB1-Gens auf die Aktivität rekonstituierter viraler Ribonukleoproteinkomplexe.....	129
IV.7.1	Polymerase-Aktivitäten des humanen Vorläufervirus A/California/1/66 und des pandemischen A/Hong Kong/1/68-Virus in 293T-Zellen.....	129
IV.7.2	Einfluss des nicht-adaptierten aviären PB1-Gens auf die Polymerase-Aktivität des humanen Vorläufervirus A/California/1/66.....	131
IV.8	Die Adaptation des aviären PB1-Gens an den Menschen und ihr Einfluss auf die Polymerase-Genauigkeit.....	132
IV.8.1	Einfluss des aviären PB1-Gens auf die Polymerase-Genauigkeit.....	133
IV.8.2	Einfluss einzelner adaptiver Mutationen des aviären PB1-Gens auf die virale Polymerase-Genauigkeit.....	134
V.	Diskussion.....	137
V.1	Einfluss des human-adaptierten aviären PB1 _{HK} -Gensegments auf die virale Replikations- und Übertragungseffizienz des pandemischen HK68-Virus.....	138
V.1.1	Einfluss der im 3'NCR des PB1 _{Cal} -Gensegments identifizierten Mutation G4 auf die virale Replikationseffizienz.....	141
V.1.2	Lokalisation der Sequenzunterschiede zwischen dem humanen PB1 _{Cal} und dem aviären PB1 _{HK} und ihr möglicher Einfluss auf die viralen Eigenschaften.....	144

V.2	Haben mögliche Interaktionen zwischen den HA- und PB1-Gensegmenten mit zur Entstehung des pandemischen HK68-Virus beigetragen?.....	149
V.3	Hätte ein an der Reassortierung beteiligtes nicht human-adaptiertes aviäres PB1-Gensegment ebenfalls zur Entstehung des pandemischen HK68-Virus beigetragen?.....	153
V.4	Haben möglicherweise veränderte, virale Polymerase-Genauigkeiten mit zu der Entstehung des pandemischen HK68-Virus beigetragen?.....	155
V.5	Modell zur Entstehung der Pandemie von 1968.....	156
VI.	Literaturverzeichnis.....	160
VII.	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....	175
VIII.	Abkürzungsverzeichnis.....	178
IX.	Anhang.....	182
Anhang A1: Rohdaten der kompetitiven Replikations- und Kontaktübertragungs-Studien		
Veröffentlichungen, Vorträge und Posterpräsentationen		
<i>Curriculum vitae</i>		
Danksagung		
Eidesstattliche Erklärung		

Zusammenfassung

Die pandemischen Influenza-Viren von 1957 und 1968 sind durch Reassortierung entstanden und tragen neben einem Hämagglutinin ebenfalls ein PB1-Gensegment aviären Ursprungs. Für das Hämagglutinin ist seit langem bekannt, dass Änderungen in dessen Epitopen entstehenden pandemischen Influenza-Viren ermöglichen der humanen Immunantwort zu entgehen. Im Gegensatz dazu ist die biologische Signifikanz des aviären PB1 bei der Entstehung pandemischer Influenza-Viren bislang noch ungeklärt. Ziel dieser Arbeit war es, diese seit langem bestehende Fragestellung zu untersuchen und aufzuklären, ob das aviäre PB1-Gen pandemischen Influenza-Viren einen replikativen Vorteil in humanen Zellen unterbreitet.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde die Reassortierung, welche zur Entstehung des pandemischen Virus von 1968 führte, mit Hilfe der Gensegmente aviärer und humaner Vorläuferviren modelliert. Ausgehend von dem humanen H2N2 Vorläufervirus A/California/1/66 (Cal66) wurden zwei rekombinante Cal66-Viruspaare generiert, deren Viren sich lediglich im Ursprung des PB1-Gensegments unterscheiden (PB1_{Cal} oder PB1_{HK}) und die entweder das humane HA des Cal66-Virus oder das aviäre HA des pandemischen A/Hong Kong/1/68 (HK68) Virus enthalten. Um zu untersuchen, ob das aviäre PB1 die virale Replikations- und Transmissionseffizienz des pandemischen HK68-Virus steigerte, wurden kompetitive Infektionen in humanen Bronchial-Epithelzellen (Calu-3), sowie kompetitive Kontaktübertragungsstudien in Meerschweinchen durchgeführt. Für die kompetitiven Infektionen wurden zum einen 1:1 Mischungen von Viren mit aviärem (PB1_{HK}) und humanem PB1 (PB1_{Cal}) über drei Passagen in Calu-3-Zellen passagiert und die Zusammensetzung der nach Passage 3 erhaltenen Virusmischungen mittels Sanger-Sequenzierung bestimmt. Zum anderen wurden Viren, welche sich im PB1-Gensegment unterscheiden, mittels reverser Genetik kompetitiv generiert. Hierfür wurden Zellen mit einem kompletten Set reverser Genetik-Plasmide, sowie einer 1:1 Mischung der Plasmide PB1_{Cal} und PB1_{HK} transfiziert und die Zusammensetzung der erhaltenen Virusmischung mittels Sequenzierung bestimmt. Um die Kontaktübertragungseffizienz von Viren mit aviärem PB1 zu untersuchen, wurde eine Gruppe von vier Meerschweinchen mit einer 1:1 Mischung der Viren rCal-HA_{HK} und rCal-(HA+PB1)_{HK} infiziert. Einen Tag nach Inokulation wurden die inokulierten Tiere mit vier naiven Kontakttieren in Kontakt gebracht und an verschiedenen Tagen nach Inokulation wurden Nasenspülungen durchgeführt, die gesammelt und mittels Sequenzierung charakterisiert

wurden. Im Rahmen der kompetitiven Replikationsstudien zeigte sich, dass Viren mit aviärem PB1, unabhängig vom Ursprung des HA-Gensegments, effizienter replizieren. Zudem wiesen humane Polymerasekomplexe mit aviärem PB1 eine erhöhte Polymerase-Aktivität auf, welche die beobachtete erhöhte virale Replikationseffizienz bedingen könnte.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde der Einfluss des aviären PB1 auf die virale Polymerase-Genauigkeit untersucht. Für das human-adaptierte aviäre PB1 des pandemischen HK68 Virus wurde beobachtet, dass dieses sich in drei human-adaptiven Mutationen von der aviären Konsensus-Sequenz unterscheidet. Um zu untersuchen, ob diese adaptiven Mutationen die Polymerase-Genauigkeit des entstehenden pandemischen Virus beeinflusst haben, wurden rekombinante HK68-Viren hergestellt, welche ein PB1 enthielten, das entweder an allen drei oder an einzelnen Aminosäure-Positionen die aviäre Konsensus-Sequenz aufwies. Für die Dreifach-Mutante mit aviär-ähnlichem PB1 war zu beobachten, dass diese gegenüber dem pandemischen HK68-Virus eine geringfügig erhöhte Mutations-Frequenz aufwies, während die Einzelmутanten rHK-PB1_{HK-V212L} und rHK-PB1_{HK-K327R} eine deutlich erhöhte Mutations-Frequenz zeigten. Diese Daten lassen vermuten, dass zunächst eine bzw. mehrere adaptive Mutationen die Polymerase-Genauigkeit der initialen Reassortante herabsetzten, während nach Adaptation der Reassortante an den Menschen durch Erwerb einer bzw. weiterer Mutationen die Polymerase-Genauigkeit wiederhergestellt wurde. Dieses Szenario würde mit der weithin akzeptierten Hypothese übereinstimmen, nach der zeitweilig reduzierte Polymerase-Genauigkeiten zu einer breiten Quasispezies-Diversität führen und somit zoonotischen Viren eine effiziente Adaptation an die neue Wirtsspezies ermöglichen.

Zusammenfassend konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass das aviäre PB1-Gen des pandemischen HK68-Virus sowohl die virale Replikationseffizienz, als auch die virale Übertragungseffizienz, vermutlich in Folge einer erhöhten Polymerase-Aktivität steigerte. Zudem könnte eine zeitweilig reduzierte Polymerase-Genauigkeit die Adaptation der initialen Reassortante an den Menschen erleichtert und damit zur Entstehung der Pandemie von 1968 beigetragen haben.

Summary

The 1957 and 1968 pandemic influenza viruses emerged via reassortment and contained HA and PB1 gene segments of avian origin. It is well known that the acquisition of an antigenically novel avian HA allowed the emerging virus to overcome pre-existing immunity in the human population. At the same time, the biological significance of the presence of the avian PB1 in pandemic influenza viruses remains elusive. In this work we wished to address this long-standing question, and to determine whether avian PB1 provided pandemic influenza viruses with some replicative advantage in humans.

In the first part of the thesis, I modelled the reassortment event that led to the emergence of the 1968 pandemic influenza virus from its avian and human precursors. Using human H2N2 virus A/California/1/66 (Cal66), two recombinant Cal66 virus pairs were generated, in which the human-origin PB1 and/or HA gene segments were substituted by corresponding avian-like gene segments of the pandemic strain A/Hong Kong/1/68 (HK68). To test, whether avian PB1 facilitated viral replication and transmission of the pandemic virus, competitive replication experiments in human bronchial epithelial cells (Calu-3), as well as competitive contact transmission experiments in guinea pigs were performed. Viral competition in Calu-3 cells was studied by making consecutive passages starting from a 1:1 mixture of viruses and determining composition of the passage 3 material by sequencing. In addition competitive rescue experiments were performed by transfecting cells with a whole set of reverse genetics plasmids which included a 1:1 mixture of PB1_{Cal} and PB1_{HK} plasmids. The composition of rescued virus mixtures was determined by sequencing. To study contact transmission efficiency of the viruses, a group of four guinea pigs was inoculated with an equal mixture of viruses. One day post-infection (p.i.) four naïve animals were co-housed with infected animals and at different days p.i. nasal washes were taken and characterized by sequencing. These studies demonstrated, that avian PB1 enhances viral replication independently of the origin of the HA gene segment, possibly due to an enhanced viral polymerase activity.

The human-adapted avian PB1 of the 1968 pandemic virus differed from the avian consensus sequence by three amino-acid substitutions. In the second part of the thesis, I determined whether these three substitutions affected viral polymerase fidelity during the emergence of the pandemic virus. To this end, I generated recombinant HK68 viruses, which contained

either individual mutations back to the avian consensus sequence or a combination of all three mutations.

The mutation frequency of the triple mutant was slightly enhanced in comparison to that of the original HK68 virus. By contrast, two of the three tested single mutants (rHK-PB1_{HK-V212L} and rHK-PB1_{HK-K327R}) showed a significantly enhanced mutation frequency. These results suggest that mutation(s) in PB1 that emerged during the avian-to-human transmission could decrease fidelity of the polymerase, and that the polymerase fidelity was later restored by additional mutation(s). This scenario would agree with the generally accepted hypothesis that a temporary decrease in fidelity could provide selective advantage for zoonotic transmission and that the fidelity is restored as soon as the virus becomes adapted to a new host species.

In summary, data obtained in this thesis demonstrate for the first time that the avian-origin PB1 of the pandemic 1968 virus served to promote viral replication and transmission. In addition, our results suggest that a temporarily reduced polymerase fidelity could have facilitated human adaptation of the emerging pandemic virus.

I. Einleitung

I.1 Molekularbiologie des Influenza-A-Virus

I.1.1 Taxonomie

Die Influenza-A-Viren werden der Familie der *Orthomyxoviridae* zugeordnet, die membranumhüllte Viren mit einem einzelsträngigen, segmentierten RNA-Genom in Negativstrangorientierung darstellen. Die Familie der *Orthomyxoviridae* umfasst die Genera der Influenza-A, -B- und -C-Viren, der Thogoto- und Isa-Viren, sowie der erst kürzlich klassifizierten Quaranjaviren (Presti *et al.*, 2009). Während die Influenza-B- und -C-Viren neben dem Menschen lediglich Robben und Schweine infizieren, weisen die Influenza-A-Viren ein relativ breites Wirtsspektrum auf, das sowohl viele Vogel- als auch Säugetierarten umfasst (Tab. I.1). Es wird angenommen, dass wildlebende Wasservögel das primäre Wirtsreservoir der Influenza-A-Viren darstellen (Webster *et al.*, 1992).

Genus (Spezies)	Mensch	Tier
Influenza-A-Virus	+	Schweine, Pferde, Robben, Puten, Enten, Möwen etc.
Influenza-B-Virus	+	Robben
Influenza-C-Virus	+	Schwein
Thogotovirus (Thogotovirus, Dhorivirus)		Rinder, Ziegen, Schafe, Nagetiere, Zecken als Vektoren
Isavirus (Infektiöses Lachsanämie Virus)		Lachse
Quaranjavirus (Johnston-Atoll-Virus, Quaranfil-Virus, Lake-Chad-Virus)		Zecken als Vektoren

Tab. I.1: Taxonomie der Orthomyxoviren. Unterteilung der *Orthomyxoviridae* in verschiedene Genera und deren Wirtsspektrum nach „Molekulare Virologie“, S. Modrow, 2.Aufl., 2003 und erweitert nach <http://ictvonline.org/>.

Die Unterteilung der Influenza-Viren in die Genera A, B und C erfolgt anhand der serologischen Charakteristika des Nukleoproteins (NP) und des Matrixproteins (M1). Des Weiteren unterscheiden sich die Genera hinsichtlich ihrer Anzahl an Gensegmenten und Oberflächenglykoproteinen. Während Influenza-A- und -B-Viren acht Gensegmente aufweisen und auf Gensegment 4 und 6 für die beiden Oberflächenglykoproteine Hämagglutinin (HA) und Neuraminidase (NA) kodieren, besitzen Influenza-C-Viren nur 7 Gensegmente. Diese kodieren auf Gensegment 4 für ein multifunktionelles Oberflächenglykoprotein, das Hämagglutinin-Esterase-Fusionsprotein (HEF), welches die Funktionen der beiden Oberflächenglykoproteine der Influenza-A-Viren in sich vereint (Herrler & Klenk, 1991).

Die Influenza-A-Viren werden des Weiteren aufgrund der Antigenvariabilität ihrer Oberflächenglykoproteine HA und NA in unterschiedliche Subtypen unterteilt. Bislang wurden 16 serologisch unterschiedliche HAs (H1 bis H16) und 9 NAs (N1 bis N9) in wildlebenden Wasservögeln nachgewiesen (Fouchier *et al.*, 2005). Allerdings wurden erst kürzlich weitere Subtypen (H17N10 und H18N11) beschrieben, deren Genom im Gegensatz zu allen anderen Influenza-A-Subtypen aus Fledermäusen isoliert wurde (Tong *et al.*, 2012; Tong *et al.*, 2013) und deren HA- und NA-Proteine sich deutlich in ihren molekularen Eigenschaften von den übrigen HAs und NAs unterscheiden (Sun *et al.*, 2013; Zhu *et al.*, 2013). Eine Isolierung und Kultivierung der H17N10- und H18N11-Wildtypisolate in aviären oder Säugerzelllinien ist bislang nicht gelungen. Die Nomenklatur der Influenza-Viren wurde 1980 von der WHO standardisiert und setzt sich aus dem Genus (A, B oder C), der Wirtsspezies, dem Ort der Erstisolation, der Nummer des Isolats, dem Jahr der Isolierung und dem HA/NA-Subtyp zusammen. Bei Influenza-A-Viren wird zudem in Klammern der Subtyp angegeben. Bei humanen Isolaten entfällt die Angabe der Wirtsspezies, z.B. A/Hong Kong/1/1968 (H3N2).

I.1.2 Morphologie

Die Virionen der Influenza-A-Viren sind von sphärischer oder filamentöser Gestalt und weisen einen Durchmesser von 80 bis 120 nm auf. Die Hüllmembran der Influenza-A-Viren stellt eine Lipiddoppelschicht dar, die sich bei der Virusfreisetzung von der Zellmembran der infizierten Wirtszelle ableitet (Kates *et al.*, 1962). In diese sind die beiden viralen, transmembranen Oberflächenglykoproteine Hämagglutinin und Neuraminidase eingelagert, welche 10 – 12 nm aus der Hüllmembran herausragen und auf elektronenmikroskopischen Aufnahmen als spike-

ähnliche Strukturen zu erkennen sind (Abb. I.1 A). Das Hämagglutinin (HA) liegt im Virion als Homotrimer vor und vermittelt sowohl die Adsorption der Virionen an endständige Sialinsäuren (N-Acetylneuraminsäure), als auch die Fusion der viralen Hüllmembran mit der endosomalen Wirtszellmembran (Skehel & Wiley, 2000). Die Neuraminidase (NA), die in ihrer aktiven Form als Homotetramer vorliegt, spaltet endständige Sialinsäuren von zellulären Glykokonjugaten ab und spielt auf Grund ihrer Rezeptor-zerstörenden Funktion eine essentielle Rolle bei der Virusfreisetzung (Air, 2012). Ein weiteres, in geringer Zahl vorliegendes, integrales Membranprotein stellt das als Homotetramer vorliegende M2-Protein dar, das als Protonenkanal wirkt. Im Inneren der Virionen liegt das virale RNA-Genom, das acht Gensegmente umfasst, in Form von viralen Ribonukleoproteinkomplexen (vRNPs) vor. Diese bestehen aus der viralen RNA, die über ihre gesamte Länge mit dem NP-Protein komplexiert und an deren 5' und 3' Enden der virale heterotrimere RNA-Polymerasekomplex, bestehend aus den Untereinheiten PB1, PB2 und PA assoziiert ist (Ruigrok *et al.*, 2010; Fodor, 2013). Des Weiteren assoziieren die RNP-Komplexe mit dem Matrixprotein M1, das aufgrund von Interaktionen mit den cytoplasmatischen Domänen der Oberflächenglykoproteine die Innenseite der Hüllmembran auskleidet und somit eine wichtige Rolle bei der Morphogenese und Stabilität der Virionen spielt. Zudem interagiert das M1-Protein mit dem nukleären Exportprotein (NS2, NEP) das nur in sehr geringer Kopienzahl vorliegt. Das Nichtstrukturprotein 1 (NS1), wie auch die erst kürzlich beschriebenen nicht-essentiellen, viralen Proteine PB1-F2 (Chen *et al.*, 2001), PB1-N40 (Wise *et al.*, 2009), PA-X (Jagger *et al.*, 2012), PA-N155 und PA-N182 (Muramoto *et al.*, 2013), sowie M42 (Wise *et al.*, 2012) können hingegen nur in infizierten Zellen, nicht jedoch in Virionen nachgewiesen werden.

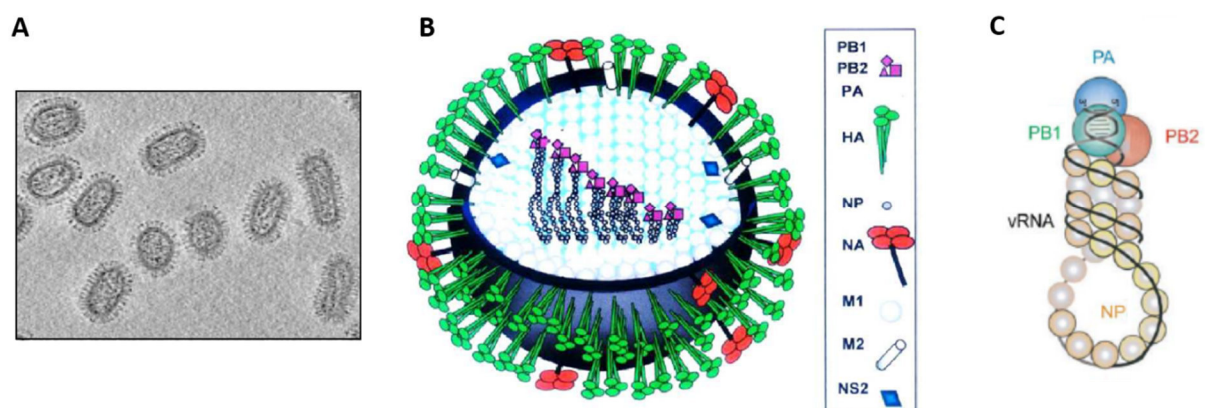


Abb. I.1: Struktur des Influenza-A-Virus. (A) Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Influenza-A-Virus Partikel (aus Calder *et al.*, 2010). (B) Schematische Darstellung des Aufbaus eines Influenza-A-Virus nach Klenk, 2005. (C) Vergrößerte schematische Darstellung des Aufbaus von viralen Ribonukleoproteinkomplexen nach Ruigrok *et al.*, 2010.

I.1.3 Genomaufbau

Das Genom der Influenza-A-Viren besteht aus acht einzelsträngigen RNA-Gensegmenten, die in negativer Orientierung (vRNA) vorliegen. Aufgrund der negativen Polarität der vRNA, kann diese nicht direkt als Boten-RNA (*messenger*-RNA, mRNA) zur Translation der viralen Proteine dienen, sondern muss zunächst mit Hilfe der viralen RNA-Polymerase in mRNA transkribiert werden. Um eine Transkription und Replikation der viralen Gensegmente zu gewährleisten, werden die kodierenden Bereiche der Gensegmente von kurzen nicht-kodierenden Sequenzbereichen flankiert. Diese können in einen hochkonservierten und einen variablen, segment-spezifischen Sequenzbereich unterteilt werden. Die hochkonservierten Sequenzbereiche sind sowohl zwischen allen acht Gensegmenten, sowie zwischen allen Influenza-A-Subtypen identisch und umfassen am 3'-Ende die ersten 12 Nukleotide, sowie am 5'-Ende die ersten 13 Nukleotide (Robertson, 1979; Desselberger *et al.*, 1980). Des Weiteren sind die beiden hochkonservierten Sequenzbereiche partiell komplementär zueinander, was es ihnen ermöglicht helikale, partielle Duplexstrukturen auszubilden (Flick & Hobom, 1999; Lee *et al.*, 2003). Diese dienen der viralen RNA-Polymerase als Promotor und enthalten alle wichtigen regulatorischen Signale für die Transkriptions- und Replikationsinitiation. Sowohl die Transkription als auch die Replikation der viralen Gensegmente erfolgt mit Hilfe der viralen RNA-abhängigen RNA-Polymerase, die aus den Untereinheiten PB1, PB2 und PA besteht und an die 5' und 3'-Enden der vRNA assoziiert ist.

Die Gensegmente PB2, HA, NP und NA des viralen Genoms kodieren für eine monozistronische mRNA. Die übrigen vier Gensegmente PB1, PA, M und NS kodieren für bi- bzw. polyzistronische mRNAs, deren Translation in zwei oder mehreren viralen Proteinen resultiert. Dabei entstehen die viralen Proteine M1, M2, sowie NS1 und NS2 durch alternatives Spleißen der bizistronischen mRNA (Cox *et al.*, 2004). Erst kürzlich wurde für das Gensegment M ein weiteres, nicht-essentiell virales Protein, das M42-Protein beschrieben, das ebenfalls durch alternatives Spleißen entsteht und funktionell das M2-Protein ersetzen kann. Dieses unterscheidet sich vom M2-Protein sowohl in den antigenen Eigenschaften seiner Ektodomäne, als auch in seiner intrazellulären Lokalisation und wird nur von einigen Virusisolaten exprimiert (Wise *et al.*, 2012). Die Gensegmente PB1 bzw. PA kodieren für die viralen Proteine PB1, PB1-F2 und PB1-N40 bzw. für PA, PA-X, PA-N155 und PA-N182. Hierbei wird das als proapoptotischer Virulenzfaktor wirkende PB1-F2-Protein (Chen *et al.*, 2001),

sowie das die Wirtsimmunantwort und die Virulenz modulierende PA-X Protein (Jagger *et al.*, 2012) in einem überlappenden Leserahmen (+1 ORF) innerhalb der PB1- bzw. PA-mRNA kodiert. Die ebenfalls erst kürzlich entdeckten, nicht-essentiellen viralen Proteine PB1-N40, PA-N155 und PA-N182 stellen jeweils N-terminal verkürzte Varianten des PB1- bzw. des PA-Proteins dar, deren Funktion bislang noch nicht abschließend geklärt ist (Wise *et al.*, 2009; Muramoto *et al.*, 2013). Die Sequenzlängen der einzelnen Gensegmente, sowie die Funktionen der von ihnen kodierten viralen Proteine sind in Tabelle I.2 aufgelistet.

Segment	Länge (nt)	Protein	Länge (aa)	Funktion und Eigenschaften
1	2341	PB2	759	Komponente des viralen Polymerasekomplexes, Bindung der Cap-Struktur von Wirtszell-mRNA, Interaktion mit NP
2	2341	PB1	757	Komponente des viralen Polymerasekomplexes, Transkription und Replikation, katalysiert Polymerisation der Nukleotide
		PB1-F2	90	Proapoptotischer Virulenzfaktor, Immunevasion, lokalisiert in den Mitochondrien, kodiert im +1 ORF, nicht-essentielles Protein
		PB1-N40	718	Besitzt keine Transkriptase-Funktion, Funktion bislang unbekannt, N-terminal verkürzte Variante von PB1, nicht-essentielles Protein
3	2233	PA	716	Komponente des viralen Polymerasekomplexes, Endonukleaseaktivität, Bindung an den Promotor
		PA-X	252	Besitzt Endonukleaseaktivität, moduliert Wirts-Immunantwort und Virulenz, kodiert im +1 ORF, besteht aus N-terminaler, sowie kurzer C-terminaler Domäne des PA, nicht-essentielles Protein
		PA-N155 PA-N182	562 535	Besitzen keine Endonukleaseaktivität, Funktion bislang unbekannt, N-terminal verkürzte Varianten von PA, nicht-essentielle Proteine
4	1778	HA	566	Typ-I Membranprotein, Oberflächenglykoprotein, Homotrimer, spaltbar in die Untereinheiten HA1 und HA2, Rezeptorbindung, Membranfusion, Induktion neutralisierender Antikörper
5	1565	NP	498	Enkapsidierung von vRNA und cRNA, Kernimport der RNPs
6	1413	NA	469	Typ-II Membranprotein, Oberflächenglykoprotein, Homotetramer, Abspaltung endständiger N-Acetylneuraminsäuren, Induktion neutralisierender Antikörper
7	1027	M1	252	Essentiell für Morphogenese, am Kernexport der RNPs beteiligt
		M2	97	Typ-III Membranprotein, Homotetramer, Protonenkanal, fördert die Freisetzung der RNPs aus dem Endosom, entsteht durch Spleißen
		M42	99	Variante des M2-Proteins mit antigenetisch distinkter Ectodomäne, kann funktionell das M2-Protein ersetzen, alternative Spleißvariante, nicht-essentielles Protein
8	890	NS1	237	Interferonantagonist, inhibiert Spleißen, Polyadenylierung und Kernexport zellulärer mRNA
		NS2/NEP	121	Vermittelt Kernexport der RNPs, Polymerase-Cofaktor, reguliert virale Polymerase-Aktivität, entsteht durch Spleißen

Tab. I.2: Funktionen und Eigenschaften der durch die Gensegmente kodierten Influenzaproteine.

Die Längen der einzelnen Gensegmente sind modifiziert nach „Molekulare Virologie“, S. Modrow, 2. Aufl., 2003 für das humane Isolat A/Hong Kong/1/68 (H3N2) angegeben.

I.1.4 Replikationszyklus

Für eine erfolgreiche virale Replikation ist das Virus auf den Wirtszellmetabolismus angewiesen. Da die virale Replikation und Transkription der Influenza-Viren im Zellkern der Wirtszelle erfolgt, müssen die viralen Ribonukleoproteinkomplexe (vRNPs) zwei Wirtszellbarrieren überwinden bevor die Replikation des viralen Genoms im Zellkern erfolgen kann. Zunächst müssen die vRNPs die Zellmembran passieren und in das Cytoplasma freigesetzt werden, bevor diese unter Zuhilfenahme von nukleären Importfaktoren in den Zellkern der Wirtszelle transportiert werden können.

Um die Freisetzung der vRNPs aus den Virionen in das Cytoplasma der Wirtszelle zu gewährleisten, adsorbieren Influenza-A-Viren im ersten Schritt des viralen Replikationszyklus an zelluläre Rezeptoren der Wirtszelle (Abb. I.2, a). Hierbei bindet das Oberflächenglykoprotein HA an endständige Sialinsäuren (N-Acetyl-Neuraminsäuren) die an Galaktosereste von glykosylierten Membranproteinen oder -lipiden gebunden sind. Hämagglutinine humaner Influenzaviren adsorbieren zumeist an α -2,6-glykosidisch gebundene Sialinsäuren, während Hämagglutinine aviärer Influenzaviren bevorzugt an α -2,3-glykosidisch gebundene Sialinsäuren binden (Rogers & Paulson, 1983; Connor *et al.*, 1994; Matrosovich *et al.*, 1997). Nach Adsorption werden die Viren mittels Rezeptor-vermittelter Endozytose in die Wirtszelle aufgenommen (Abb. I.2, b). Die hierbei entstandenen Endozytosevesikel fusionieren innerhalb der Zelle mit zellulären Endosomen, deren pH-Wert im Zuge der Reifung vom frühen zum späten Endosom durch H^+ -ATPasen herabgesetzt wird. Aufgrund der Ansäuerung der Endosomen wird eine Konformationsänderung des HA induziert, in deren Folge ein hydrophobes Fusionspeptid am N-Terminus des HA2-Proteins exponiert wird. Dieses inseriert in die endosomale Wirtszellmembran und veranlasst die Fusion mit der viralen Hüllmembran (Cox *et al.*, 2004) (Abb. I.2, c). Voraussetzung für die Fusion ist, dass das HA in die Untereinheiten HA1 und HA2 gespalten vorliegt (Klenk *et al.*, 1975). Des Weiteren wird durch den in die virale Hüllmembran eingelagerten Protonenkanal M2 eine Ansäuerung des Virusinneren initiiert, wodurch die vRNPs von den Matrixproteinen M1 dissoziieren und über Fusionsporen in das Cytoplasma der Zelle freigesetzt werden (Abb. I.2, c). Im Cytoplasma diffundieren die freigesetzten vRNPs unabhängig von Mikrotubuli oder Aktinfilamenten innerhalb von 20 Minuten zum Zellkern, wo diese vermittelt durch das Kernlokalisationssignal des NP-Proteins mit Hilfe zellulärer Importine in den Zellkern

transportiert werden (Resa-Infante & Gabriel, 2013; Hutchinson & Fodor, 2013) (Abb. I.2, d). Im Zellkern erfolgt zunächst die frühe Phase der viralen Transkription in deren Verlauf das virale Genom mit Hilfe des viralen Polymerasekomplexes in mRNA transkribiert wird (Abb. I.2, e). Da der virale Polymerasekomplex nicht die Fähigkeit besitzt die 5'-Enden der mRNA mit einer Cap-Struktur zu versehen bzw. diese zu methylieren, bedient er sich zur Transkriptionsinitiation eines Mechanismus der als „*Cap-Snatching*“ bezeichnet wird. Hierfür bindet die PB2-Untereinheit des viralen Polymerasekomplexes zunächst die 5'Cap-Struktur einer neu synthetisierten zellulären prä-mRNA und lagert diese an das 3'-Ende der vRNA an. Durch die Endonukleaseaktivität der PA-Untereinheit wird die 5'Cap-Struktur nach 10-13 Nukleotiden von der zellulären prä-mRNA abgespalten (Dias *et al.*, 2009; Yuan *et al.*, 2009), wodurch ein freies 3'-OH-Ende entsteht das als Primer für die Transkriptionselongation durch die PB1-Untereinheit fungiert (Biswas & Nayak, 1994). Die Transkriptionselongation endet etwa 15 – 22 Nukleotide vor dem 5'-Ende der vRNA. In diesem Bereich kodiert die vRNA für 5 – 7 Uridinreste, welche als Polyadenylierungssignal dienen. Da die Transkription in „cis“ durch die an den vRNPs gebundene Polymerase erfolgt, kommt es aufgrund des gebundenen 5'-Endes der vRNA zu einer sterischen Hinderung, die zum „Stottern“ des Polymerasekomplex und zum Abbruch der Transkription führt (Fodor, 2013). Die Transkripte der Gensegmente M und NS werden anschließend von den zellulären Spleißosomen teilweise gespleißt und zusammen mit den übrigen Transkripten mittels des zellulären Kernexportfaktors NXF1 durch die Kernporen ins Cytoplasma transportiert (York & Fodor, 2013) (Abb. I.2, f).

Die Proteinsynthese der viralen Membranproteine HA, NA und M2 erfolgt am rauen Endoplasmatischen Retikulum (rER) (Abb. I.2, g). Diese besitzen ein Signalpeptid anhand dessen die naszierenden Polypeptide in das ER transloziert und durch eine Transmembrandomäne in der Membran des ER verankert werden. Auf dem Weg vom ER über das Golgi- und Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) zur Zellmembran werden die Membranproteine glykosyliert, sowie die HA und M2-Proteine im Golgi-Apparat palmitoyliert. Des Weiteren werden HAs mit einer multibasischen Spaltstelle im TGN durch ubiquitär vorkommende Proteasen wie Furin in die Untereinheiten HA1 und HA2 gespalten (Garten & Klenk, 2008) (Abb. I.2, h).

Die Proteinsynthese der übrigen Proteine PB1, PB2, PA, NP, M1, NS1 und NS2 erfolgt an freien Ribosomen im Cytoplasma (Abb. I.2, i). Diese werden vermittelt durch ihre Kernlokalisationssignale mit Hilfe von zellulären Importinen zurück in den Zellkern transportiert (Hutchinson & Fodor, 2012) (Abb. I.2, j). Liegen diese in ausreichenden Mengen im Zellkern vor, assemblieren sich neusynthetisierte, freie virale Polymerasekomplexe, welche die Transkription zum Erliegen bringen und die Replikation der vRNPs in „trans“ einleiten (Abb. I.2, k). Im Gegensatz zur initialen Transkription erfolgt die Replikation durch neusynthetisierte, nicht an den vRNP-Komplex assoziierte Polymerasekomplexe. Hierbei dienen die vRNPs als Matrize für die Synthese von cRNA. Diese wird von NP-Proteinen enkapsidiert und dient erneut als Matrize zur Synthese von vRNA (Fodor, 2013). Die neusynthetisierte vRNA assoziiert im Zellkern mit freien Polymerase- und NP-Proteinen zu vRNPs, welche vermittelt durch die Proteine M1 und NEP an den nukleären Exportfaktor Crm gebunden und ins perinukleäre Cytoplasma transportiert werden (Abb. I.2, l). Von dort aus werden die vRNPs durch Interaktion mit Rab11 über das vesikuläre Transportsystem entlang der Mikrotubuli zur Cytoplasmamembran transportiert (Abb. I.2, m). Dort interagiert das Matrixprotein M1 mit den in die Cytoplasmamembran eingelagerten Oberflächenglykoproteinen HA, NA und M2 und leitet den Knospungsprozess ein (Hutchinson & Fodor, 2013) (Abb. I.2, n). Hierbei stülpt sich die Cytoplasmamembran um die vRNPs und einzelne Virionen werden mittels Knospung an der Zelloberfläche freigesetzt (Abb. I.2, o). Währenddessen spaltet die NA endständige N-Acetylneuraminsäurereste von der Cytoplasmamembran der Wirtszelle ab aus der die virale Hüllmembran hervorgeht. Hierdurch wird eine erneute Infektion der Wirtszelle, sowie eine Verklumpung der Virionen untereinander verhindert und somit eine effiziente Freisetzung und Ausbreitung der Nachkommenviren ermöglicht.

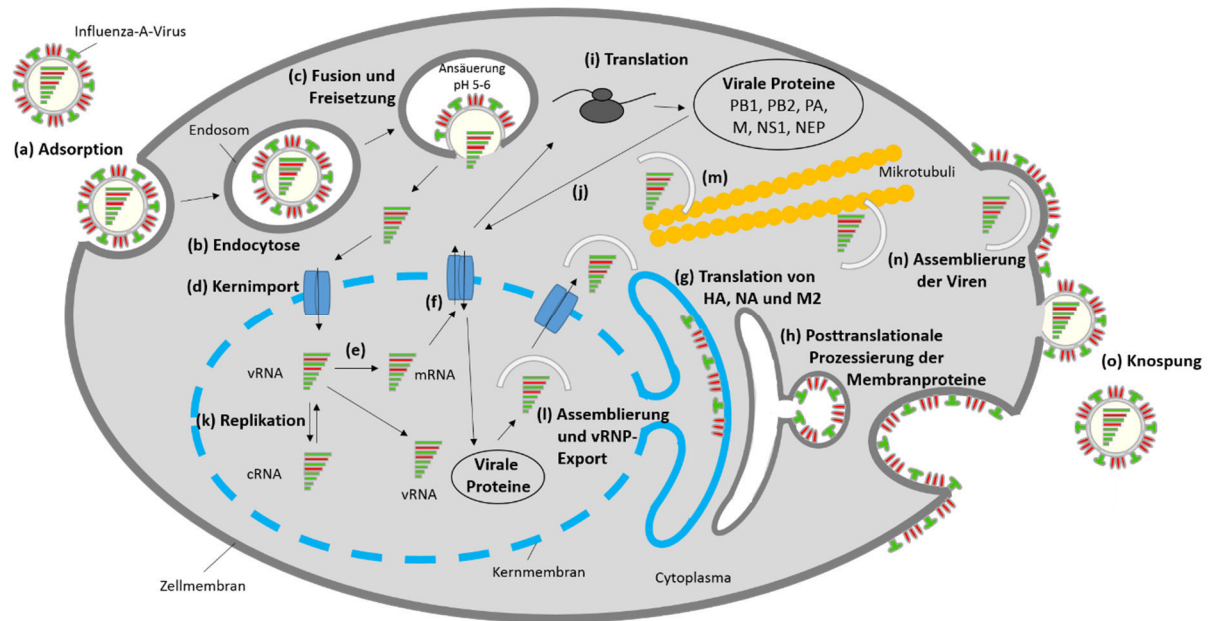


Abb. I.2: Schematische Darstellung des Replikationszyklus der Influenza-A-Viren modifiziert nach Naffakh *et al.*, 2008

I.2 Pathogenese

I.2.1 Klinik und Pathogenese beim Menschen

Influenzaviren werden von Mensch zu Mensch durch virushaltige Aerosole übertragen, die beim Niesen oder Husten freigesetzt werden. Neben Tröpfcheninfektionen sind auch Schmierinfektionen durch Berührung kontaminierter Oberflächen (Hände) möglich (Sorrell *et al.*, 2011). Zu Beginn der Infektion gelangen die Influenzaviren in den oberen Respirationstrakt und infizieren dort die Epithelzellen des Nasopharynxbereiches. Von dort aus breitet sich die Infektion über die Trachea bis in die Bronchien und Bronchiolen aus, wo es in Folge der Infektion zu einer Zerstörung des Flimmerepithels und der schleimproduzierenden Hautschichten kommt, in deren Folge vermehrt Mukus produziert wird. Bei primären, viralen Lungenpneumonien breitet sich die Infektion in den unteren Respirationstrakt aus. Hierdurch werden die Viren auf die Epithelien des Lungenparenchyms übertragen, die Alveolarwände schwellen an und in Folge der Zerstörung des Epithels kommt es zum Blutausfluss aus den umliegenden Kapillaren. Der interalveoläre Raum füllt sich dabei mit Blut und Mukus, wodurch der Sauerstofftransport unterbunden wird (Modrow *et al.*, 2003).

Bei einer symptomatischen Infektion treten nach einer Inkubationszeit von 1 bis 5 Tagen erste Krankheitssymptome, wie Kopfschmerzen, Husten, Schnupfen, Kältegefühl und Schüttelfrost auf. Anschließend tritt hohes, rasch ansteigendes Fieber bis 41°C ein, das zumeist von Muskelschmerzen, Appetitlosigkeit und allgemeinem Schwächegefühl begleitet wird. Nach 3 bis 6 Tagen nach Beginn der Symptome geht normalerweise das Fieber wieder zurück und das Virus ist aus dem Körper eliminiert (Modrow *et al.*, 2003). Schwerwiegende Komplikationen stellen primäre, virale interstitielle Lungenpneumonien dar, von denen vor allem ältere und immunsupprimierte Patienten, sowie Patienten mit chronischen pulmonären und kardiovaskulären Vorerkrankungen betroffen sind (Modrow *et al.*, 2003). Weitere häufige Komplikationen stellen sekundäre bakterielle Überinfektionen mit *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* und *Haemophilus influenzae* dar, die zumeist in Lungenentzündungen resultieren. Seltener auftretende Komplikationen sind Myositiden, Myokarditen, sowie das Reye-Syndrom, eine oftmals tödlich verlaufende Krankheit im Kindesalter mit schwerer Hirn- und Leberschädigung (Modrow *et al.*, 2003).

I.2.2 Therapie und Prophylaxe

Zur Behandlung von Influenza-Infektionen werden momentan zwei verschiedene antivirale Wirkstoffe eingesetzt: Zum einen M2-Ionenkanal-Blocker, sogenannte Adamantane wie Amantadin und Rimantadin, welche die Funktion des M2-Ionenkanals inhibieren und somit eine effiziente Freisetzung der viralen Nukleokapsidkomplexe in das Cytoplasma verhindern. Und zum anderen Neuraminidase-Inhibitoren, zu denen die Virostatika Oseltamivir und Zanamivir zählen. Diese stellen Sialinsäureanaloga dar, welche die katalytische Aktivität der Neuraminidase inhibieren und dadurch eine effiziente Virusfreisetzung verhindern (Lee & Yen, 2012). Da sich in den letzten Jahren vermehrt Resistenzen gegenüber den gängigen M2-Ionenkanal-Blockern und Neuraminidase-Inhibitoren ausgebildet haben, wurden in den letzten Jahren vermehrt verbesserte Virostatika entwickelt. Dies resultierte zum einen in der Entwicklung neuer, verbesserter Neuraminidase-Inhibitoren, wie Peramivir und Laninamivir, die sich strukturell von anderen Neuraminidase-Inhibitoren unterscheiden. Aufgrund der strukturellen Unterschiede können diese mehrfach im aktiven Zentrum der Neuraminidase binden und somit Resistenzen vorbeugen (Ison, 2011; Das, 2012). Neben neuen M2-Ionenkanalinhibitoren, wie den Spiroperidinen, die ebenfalls im M2-Ionenkanal binden und stärkere inhibitorische Effekte erzielen (Lee & Yen, 2012; Das, 2012), befinden sich momentan

viele weitere antivirale Wirkstoffe in Entwicklung, die sich größtenteils entweder gegen den viralen Ribonukleoproteinkomplex (Ribavirin, Favipiravir (T-705), Flutimide, Protein-Protein-Interaktions Inhibitoren, Nukleozin, Naproxen) oder das Hämagglutinin (Arbidol, Cyanovirin N, Peptid-mimetische Inhibitoren) richten und die virale Replikation bzw. den Viruseintritt in die Zelle inhibieren (Ison, 2011; Das, 2012; Lee & Yen, 2012; Barik, 2012).

Zur Prophylaxe von Influenza-Infektionen werden trivalente Influenza-Impfstoffe hergestellt, die größtenteils gegen die zirkulierenden, saisonalen Influenza-Viren gerichtet sind. Hierbei handelt es sich bei den in Deutschland durch das Paul-Ehrlich-Institut zugelassenen Influenza-Impfstoffen, ausschließlich um inaktivierte Spalt- oder Untereinheiten-Vakzine, die als Hauptbestandteile die Oberflächenglykoproteine der jeweils zirkulierenden Influenza-Viren enthalten und intramuskulär verabreicht werden (<http://www.pei.de/DE/arzneimittel/impfstoff-impfstoffe-fuer-den-menschen/influenza-grippe/influenza-grippe-node.html>; abgerufen am 24.06.2014). Auf Grund der hohen Antigenvariabilität der Oberflächenglykoproteine werden die Impfstoffe jedes Jahr auf Empfehlung der *WHO* neu an die epidemiologische Situation und die zirkulierenden Virustypen angepasst. Entsprechend den Empfehlungen der *WHO* vom 20. Februar 2014 sollten die trivalenten Influenza-Impfstoffe für die Influenza-Saison 2014/2015 (nördliche Hemisphäre) die Virusstämme A/California/7/2009 (H1N1), A/Texas/50/2012 (H3N2) und B/Massachusetts/2/2012 enthalten (http://www.who.int/influenza/vaccines/virus/recommendations/2014_15_north; abgerufen am 24.06.2014).

Zur Herstellung inaktivierter Spalt- oder Untereinheiten-Vakzine werden zunächst mittels klassischer Ei-Reassortierung Saatviren hergestellt, welche im Hintergrund des A/Puerto Rico/8/34 (H1N1)-Virus die Oberflächenglykoproteine der saisonalen Viren tragen. Diese werden zum Beimpfen embryonierter Hühnereier verwendet. Nachdem die virushaltige Allantoisflüssigkeit geerntet, gereinigt, ankonzentriert und inaktiviert wurden, werden die Oberflächenglykoproteine zu einem Impfstoff zusammengefügt (Neumann *et al.*, 2009).

Um nicht mehr von der Verfügbarkeit von Hühnereiern abhängig zu sein und die Produktionskapazitäten der Impfstoffe, insbesondere im Pandemiefall steigern, sowie Menschen mit Hühnereiweißallergien impfen zu können, sind die Impfstoffhersteller zunehmend bestrebt zellkulturbasierte Impfstoffe in Suspensionszelllinien herzustellen.

Neben den hierzulande zugelassenen inaktivierten Vakzinen sind in den USA auch attenuierte Lebendimpfstoffe für gesunde, junge Erwachsene zugelassen (Neumann *et al.*, 2009).

I.3 Evolution, Ökologie und Epidemiologie des Influenza-A-Virus

I.3.1 Aviäre Influenza

In Wasservögeln findet die virale Replikation hauptsächlich im Gastrointestinaltrakt bei einer Temperatur von 40°C statt. Die Virusübertragung erfolgt dementsprechend fäkal-oral über kontaminiertes Wasser.

In wildlebenden Wasservögeln, die das natürliche Wirtsreservoir der Influenza-A-Viren darstellen, verlaufen Infektionen mit aviären Influenza-A-Viren meist asymptomatisch oder führen nur zu sehr milden Krankheitssymptomen. Bei diesen Viren handelt es sich um niedrigpathogene aviäre Influenza-Viren. Diese werden auf Grund ihrer Pathogenität von den zumeist Geflügel infizierenden hochpathogenen aviären Influenza-Viren der Subtypen H5 und H7 unterschieden. Allerdings scheinen sich hochpathogene aviäre Influenza-Viren nicht mehr nur ausschließlich auf Geflügel zu begrenzen, da Rückübertragungen hochpathogener H5N1-Viren von domestiziertem Geflügel auf Wassergeflügel beobachtet wurden (Klenk, 2013).

Hochpathogene Influenza-Viren entstehen, wenn niedrigpathogene Viren der Subtypen H5 und H7 von Wasservögeln auf Hühner übertragen werden und diese in Folge von Insertion das Spaltmotiv im Hämagglutinin verändern. Dieses stellt einen wichtigen molekularen Pathogenitätsmarker dar, anhand dessen aviäre Influenza-Viren neben der üblichen Klassifizierung in HA und NA-Subtypen, in niedrigpathogene und hochpathogene aviäre Viren unterteilt werden. Niedrigpathogene Influenza-Viren weisen eine monobasische Spaltstelle (-R-) auf, die durch die im Respirations- und Gastrointestinaltrakt lokalisierten trypsin-ähnlichen Serinproteasen TMPRSS2 und HAT erkannt wird und in lokalisierten Infektionen resultiert (Böttcher-Friebertshäuser *et al.*, 2013). Hochpathogene Influenza-Viren weisen hingegen multibasische Spaltstellen (R-X-K/R-R) auf. Diese werden durch die ubiquitär vorkommenden subtilisin-ähnlichen Serinproteasen Furin und PC5/6 gespalten und ermöglichen somit eine systemische Virusausbreitung, die mit dem hochpathogenen Phänotyp dieser Viren einhergeht. Hierbei wird angenommen, dass multibasische Spaltmotive durch Nukleotid-Insertionen in Hämagglutinine niedrigpathogener Viren entstehen. Als Insertionsmechanismen wurde Rekombination mit anderen viralen Gensegmenten und zellulärer mRNA, sowie Stottern der Polymerase beschrieben (Garten & Klenk, 2008). Warum diese Insertionen jedoch nur bei den Subtypen H5 und H7 auftreten ist bislang ungeklärt.

I.3.2 Humane Influenza

Jedes Jahr erkranken in Folge von Influenza-Epidemien schätzungsweise 5-15% der menschlichen Bevölkerung an Influenza (WHO). Diese Influenza-Epidemien treten jährlich von Oktober bis April auf der nördlichen Hemisphäre und von Mai bis September auf der südlichen Hemisphäre auf und werden von Influenza-A- und -B-Viren hervorgerufen (Cox & Subbarao, 2000). Influenza-Pandemien hingegen treten nur sporadisch auf, werden ausschließlich von Influenza-A-Viren verursacht und gehen oftmals mit schwereren Krankheitsverläufen und erhöhten Mortalitätsraten einher (Taubenberger & Kash, 2010). Die epidemische Influenza, welche auch als inter pandemische Influenza bezeichnet wird, geht aus der pandemischen Influenza, in Folge von Antigenverschiebungen (*Antigen drift*) hervor und zeichnet sich im Vergleich zu den Influenza-Pandemien durch geringere Fallzahlen, mildere Verlaufsformen und regionales Auftreten aus (Klenk, 2013). Der für die Influenza-Epidemien verantwortliche *Antigen drift* ist auf die virale RNA-Polymerase zurückzuführen, die aufgrund einer fehlenden Korrekturlesefunktion (*Proofreading*) eine Mutationsrate von 10^{-5} - 10^{-6} Mutationen pro Nukleotid/Replikationszyklus aufweist (Nobusawa & Sato, 2006, Wong *et al.*, 2011). Hierdurch kommt es zu kontinuierlichen, zufälligen Veränderungen des viralen Genoms, die u.a. in Punktmutationen in den Epitopen der Oberflächenglykoproteine resultieren können. Durch den zusätzlichen Selektionsdruck durch das Immunsystem kommt es zu einer Anhäufung von Punktmutationen in den Epitopen der Oberflächenglykoproteine, wodurch Virusmutanten der Immunantwort entgehen können und somit einen Selektionsvorteil erhalten (Schrauwen *et al.*, 2014). Hierdurch kommt es zu einer Fixierung der Mutationen in der Viruspopulation, die diesen Viren ermöglicht über längere Zeit in der menschlichen Bevölkerung zu zirkulieren.

Von den bislang 18 identifizierten Influenza-HA-Subtypen wurden bislang lediglich die drei HA-Subtypen H1, H2 und H3 in Folge von Pandemien in die menschliche Bevölkerung eingeführt (Morens *et al.*, 2009). Allerdings kam es in den letzten Jahren insbesondere in Südostasien zu transienten Übertragungen von aviären Viren der Subtypen H5, H7 und H9N2 auf den Menschen (Horimoto & Kawaoka, 2005; Taubenberger & Kash, 2010; Klenk *et al.*, 2011; Schrauwen *et al.*, 2014). Diese Infektionen führten oftmals in Folge von systemischen Infektionen zu schweren Krankheitsverläufen. Bislang konnte noch keine Adaptation dieser Viren an den Menschen beobachtet werden. Jedoch geht von diesen Viren erhebliches pandemisches Risiko aus, da der Mensch diesen Viren gegenüber immunologisch naiv ist (Klenk, 2013).

I.3.3 Wirtsspektrum der Influenza-A-Viren und ihre Übertragung zwischen den Spezies

Das natürliche Wirtsreservoir der Influenza-A-Viren stellen wildlebende Wasservögel der Gattungen Anseriformes (Enten, Gänse und Schwäne) und Charadriiformes (Möwen und Watvögel) dar (Webster *et al.*, 1992). In diesen konnten bislang 105 der 144 möglichen HA-NA-Subtypkombinationen nachgewiesen werden, während beim Menschen, Schwein, Pferd und anderen Säugetierspezies lediglich bestimmte Influenza-Virus Subtypen beobachtet wurden (Olsen *et al.*, 2006). Diesbezüglich konnte zudem in phylogenetischen Studien gezeigt werden, dass alle im Menschen und in Säugetieren vorkommenden Influenza-Viren aviären Ursprungs sind (Gorman *et al.*, 1990; Worobey *et al.*, 2014).

Wie allerdings in der Vergangenheit immer wieder beobachtet werden konnte und die Verteilung der Influenza-Subtypen innerhalb der unterschiedlichen Wirtsspezies vermuten lässt, stellt die Wirtsbarriere kein unüberwindbares Hindernis dar. Insbesondere in Asien kommt es durch engen Kontakt mit infizierten Vögeln immer wieder zu Übertragungen von aviären Influenza-A-Viren auf den Menschen und andere Säugetierspezies. Diese Übertragungen erfolgen zumeist nur transient. In seltenen Fällen hingegen kann es durch Reassortierung bzw. zahlreicher adaptiver Mutationen, zumeist in Folge wiederholter Übertragung, zur Adaptation eines aviären Virus an die neue Wirtsspezies und somit zur Etablierung einer neuen Viruslinie kommen (Taubenberger & Kash, 2010; Reperant *et al.*, 2012; Klenk, 2013). Da der Mensch nur bei wenigen Aktivitäten, wie beim Jagen, mit wildlebenden Wasservögeln in Kontakt kommt, wird angenommen dass die Übertragung aviärer Influenza-A-Viren von wildlebenden Wasservögeln auf den Menschen zumeist über tierische Zwischenwirte erfolgt; wenn auch die direkte Übertragung durch z.B. kontaminiertes Wasser möglich zu sein scheint (Reperant *et al.*, 2012). Insbesondere domestiziertes Geflügel (Hühner, Wachteln) und Schweine werden als tierische Zwischenwirte in Betracht gezogen, da diese sowohl mit wildlebenden Wasservögeln (geteilte Habitate), als auch mit dem Menschen (Haustier, Nahrungsquelle) in Kontakt kommen. Zudem wird das Schwein, das sowohl den humanen als auch den aviären Rezeptor im Respirationstrakt exprimiert und somit die Replikation aviärer und humaner Influenza-Viren erlaubt, als „Mischgefäß“ (*mixing vessel*) für Genreassortierungen angenommen, die in der Entstehung von pandemischen Viren resultieren können (Scholtissek *et al.*, 1991; Klenk *et al.*, 2011).

I.3.4 Virale Determinanten des Wirtsspektrums

Nachdem aviäre Influenza-Viren erfolgreich von wildlebenden Wasservögeln auf einen tierischen Zwischenwirt oder direkt auf den Menschen übertragen wurden, besteht die nächste Barriere in der Virus-Zell-Interaktion. Damit ein aviäres Virus die Zellen einer neuen Wirtsspezies effizient infizieren kann, kommt es in Folge von wiederholten Übertragungen zu verschiedensten adaptiven Mutationen in den viralen Proteinen, die es dem Virus ermöglichen effizient mit den Wirtszellfaktoren zu interagieren.

Eine erste Wirtszellbarriere, die hierbei überwunden werden muss, stellt die zelluläre Cytoplasmamembran dar. Während aviäre Influenza-Viren bevorzugt an α -2,3-gebundene Sialinsäuren binden, die von aviären, intestinalen Epithelzellen, sowie von humanen Alveolar-Epithelzellen (Typ II-Pneumocyten) exprimiert werden, binden humane Influenza-Viren bevorzugt an α -2,6-gebundene Sialinsäuren, die vor allem von humanen Epithelzellen des oberen Respirationstrakts, der Trachea und den Bronchien exprimiert werden (Matrosovich *et al.*, 2004; Shinya *et al.*, 2006). Um eine effiziente Adsorption aviärer Influenza-Viren an die Epithelzellen des oberen humanen Respirationstrakts zu ermöglichen, muss mit der Adaptation aviärer Influenza-Viren an den Menschen eine Änderung der Rezeptorspezifität des HA von der Bindung α -2,3-gebundener Sialinsäuren hin zur Bindung α -2,6-gebundener Sialinsäuren einhergehen. Einige bekannte adaptive Mutationen, welche in der Rezeptorbindedomäne lokalisiert sind und die Bindung an α -2,6-gebundene Sialinsäuren verstärken, sind die Mutationen E190D, G225D, Q226L und G228S (Matrosovich *et al.*, 2000). Die virale Rezeptorspezifität bestimmt somit nicht nur den Wirtstropismus, sondern auch den Gewebstropismus (van Riel *et al.*, 2007). So wurde vermutet, dass die fehlende Expression von α -2,3-gebundenen Sialinsäuren in Epithelzellen des oberen Respirationstrakts, mit zu der ineffizienten Mensch-zu-Mensch Übertragbarkeit aviärer H5N1-Viren beigetragen haben könnte (Shinya *et al.*, 2006). Ebenfalls mit dem Gewebstropismus einhergehend wurde für die pandemischen H1N1-Viren von 2009 gezeigt, dass die Rezeptorspezifität auch Einfluss auf die Pathogenität und Virulenz von Influenza-Viren nimmt (Chutinimitkul *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2010; Belser *et al.*, 2011; Abed *et al.*, 2011; Zheng *et al.*, 2010).

Um nach der Adsorption die Fusion der viralen Hüllmembran mit der endosomalen Wirtszellmembran vermitteln zu können, muss das HA niedrig-pathogener aviärer, sowie humaner Influenza-Viren beim Eintritt in die Zelle durch Wirtszellproteasen in seine

fusionsaktive Form gespalten werden. Dies erfolgt durch die Serinproteasen HAT und TMPRSS2, die in den Epithelien des oberen, humanen Respirationstrakts exprimiert werden (Böttcher *et al.*, 2006). Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass sich die aviären HAs der 16 verschiedenen Subtypen, sowie unterschiedliche humane HAs deutlich in ihrer Spaltbarkeit durch die Wirtszellproteasen HAT und TMPRSS2 unterscheiden (Galloway *et al.*, 2013). Dies lässt vermuten, dass neben der Rezeptorspezifität, auch die Verfügbarkeit von HA-spaltenden Wirtszellproteasen den Wirts- und Gewebstropismus, sowie die Pathogenität der Viren bestimmt (Klenk & Garten, 1994; Steinhauer, 1999).

Neben der Verfügbarkeit von HA-spaltenden Wirtszellproteasen ist für eine erfolgreiche Fusion ebenfalls essentiell, dass das HA eine an die Wirtszelle angepasste pH-Stabilität aufweist. Diesbezüglich konnte in neueren Studien gezeigt werden, dass sich die pH-Optima aviärer, porciner und humaner HAs teils deutlich voneinander unterscheiden und dass humane HAs ein geringeres pH-Optimum aufweisen als aviäre HAs (Galloway *et al.*, 2013; Shelton *et al.*, 2013). Dementsprechend muss sich bei der Adaptation aviärer Influenza-Viren an den Menschen das pH-Optimum des HA an den pH-Wert der Zellen der neuen Wirtsspezies anpassen, um zu verhindern dass das HA vorzeitig in die fusionsaktive Form übergeht und es zur Virusinaktivierung kommt (Imai *et al.*, 2012).

Die zweite Wirtszellbarriere, die neben der Cytoplasmamembran überwunden werden muss, stellt die zelluläre Kernmembran dar. Damit das virale Genom der Influenza-Viren effizient im Wirtszellkern repliziert werden kann, werden die vRNPs, wie auch die viralen Polymeraseproteine PB2 und NP über den klassischen Importin α/β -Signalweg in den Nukleus importiert (Gabriel *et al.*, 2008), während die Polymeraseproteine PB1 und PA als Dimere über den nicht-klassischen Importin α -Signalweg importiert werden (Gabriel *et al.*, 2013). Hierbei ist es essentiell, dass sowohl die vRNPs, als auch die viralen Polymeraseproteine effizient über ihre Kernlokalisationssignale mit den zellulären Importfaktoren interagieren. Um dies zu gewährleisten tritt während der Adaptation aviärer Influenza-A-Viren an den Menschen oftmals die im Kernlokalisationssignal des PB2-Proteins lokalisierte Mutation D701N auf. Diese verstärkt zusammen mit der im NP-Protein lokalisierten Mutation N319K die Interaktion mit dem zellulären Kernimportfaktor Importin α -7, in Folge einer Konformationsänderung des PB2-Proteins (Tarendeau *et al.*, 2007). Dementsprechend wird der Kernimport der PB2- und NP-Proteine hoch-pathogener aviärer H7N7-Viren mit der Signatur PB2-701D und NP-319N in humanen Zellen durch die Importine α -1 und α -3 vermittelt, während die entsprechenden

Maus-adaptierten aviären H7N7-Viren mit der Signatur PB2-701N und NP-319K durch die Importine α -1 und α -7 in den Nukleus gelangen (Gabriel *et al.*, 2011).

Neben der Mutation PB2-D701N stellt die Mutation PB2-E627K eine weitere Determinante des viralen Wirtsspektrums dar. Diese ist am C-terminalen Ende des PB2 in der sog. „627-Domäne“ lokalisiert und grenzt strukturell an die sogenannte „Importin-alpha Bindedomäne“, welche die Aminosäureposition 701 enthält. Bezüglich der Funktion dieser Mutation bestehen bis heute lediglich verschiedene Hypothesen. So konnte gezeigt werden, dass die „627-Domäne“ beim Auftreten der Mutation PB2-E627K ein stark basisches Oberflächenpotential erhält, das mit einer erhöhten RNA-Bindeaktivität einhergeht (Tarendeau *et al.*, 2008). Da die „627-Domäne“ zudem strukturell sehr stark zellulären Clamp-Loader-Komplexen ähnelt, wurde postuliert dass die Mutation PB2-E627K die Bindung des viralen Polymerasekomplexes an RNA verstärken könnte (Kuzuhara *et al.*, 2009). Außerdem wurde für die Mutation PB2-E627K beschrieben, dass diese die Interaktion zwischen PB2 und NP verbessern und somit zu einer effizienteren Assemblierung der vRNP-Komplexe beitragen könnte (Labadie *et al.*, 2007; Mehle & Doudna, 2008). Auf Grund der Tatsache, dass neben den Proteinen PB2 und NP auch die vRNPs über den klassischen Importin α/β -Signalweg in den Nukleus importiert werden, könnte eine verstärkte PB2-NP-Interaktion auch mit einem effizienteren vRNP-Kernimport einhergehen (Boivin & Hart, 2011). Diesbezüglich konnte erst kürzlich gezeigt werden, dass PB2-E627K-vRNP Komplexe effizienter Importin α -1 und α -7 rekrutierten, während sich dieser Effekt nicht, wie im Fall der Mutation PB2-D701N, für PB2-Monomere beobachten lies (Hudjetz & Gabriel, 2012).

Neben einer erhöhten RNA-Bindung und einem effizienteren vRNP-Kernimport, wurde für Mutation PB2-E627K zudem beschrieben, dass diese die Adaptation hoch-pathogener aviärer H5N1-Viren an die verringerte Körpertemperatur von 33°C im oberen Respirationstrakt von Säugern vermitteln (Massin *et al.*, 2001; Hatta *et al.*, 2007), und damit zu einer verbesserten Übertragbarkeit von säuger-adaptierten aviären H5N1 und H7N9 Viren beitragen könnte (Steel *et al.*, 2009; Van Hoeven *et al.*, 2009; Herfst *et al.*, 2012; Gao *et al.*, 2013).

Neben der Mutation PB2-E627K wurden viele weitere adaptive Mutationen beschrieben, welche diese funktionell kompensieren können. Bei diesen handelt es sich unter anderem um die Mutationen PB2-G590S/Q591R (Mehle & Doudna, 2009), PB2-T271A (Bussey *et al.*, 2010), PB2-E158G (Zhou *et al.*, 2011), PB1-L473V und -L598P (Xu *et al.*, 2012) PA-T552S (Mehle *et al.*, 2012) und NEP-M16I, -Y41C und -E75G (Mänz *et al.*, 2012).

All diesen Studien zu Folge stellen die beiden Mutationen PB2-D701N und PB2-E627K bislang die wichtigsten Determinanten des vRNP-Komplexes dar, welche das virale Wirtsspektrum bestimmen. Diese vermitteln sowohl eine effizientere Interaktion mit zellulären Faktoren, als auch die Kompatibilität der viralen Proteine untereinander und ermöglichen somit eine effiziente virale Replikation adaptierter aviärer Influenza-Viren in Säugierzellen.

Neben einer effizienten viralen Replikation ist auch eine effiziente Virusfreisetzung essentiell für die Adaptation aviärer Viren an den Menschen. Hierbei können sowohl die zelluläre Kernmembran, wie auch die Cytoplasmamembran erneut Wirtszellbarrieren darstellen. Während bislang unbekannt ist, ob es beim Kernexport der vRNP-Komplexe zu spezie-spezifischen Unterschieden kommt, ist seit langem bekannt dass die Rezeptorspezifität des HA mit der Substratspezifität des NA korreliert, um sowohl eine effiziente Virusadsorption, als auch eine effiziente Virusfreisetzung zu ermöglichen (Wagner *et al.*, 2002).

Damit aus einem zoonotischen Influenza-Virus letztlich ein humanes Influenza-Virus werden kann, muss dieses effizient von Mensch-zu-Mensch übertragbar sein, um in der menschlichen Bevölkerung zirkulieren zu können. Diesbezüglich konnte im Rahmen von Transmissionsstudien gezeigt werden, dass ein minimales Set von vier human-adaptiven Mutationen, welche im HA mit Änderungen in der Rezeptorspezifität (HA-Q222L/G224S; HA-N224K/Q226L), einer erhöhten pH-Stabilität (HA-T318I), und einer verringerten Oberflächenglykosylierung (HA-T156A; HA-N158D) einhergehen, sowie im PB2-Protein in der Mutation E627K resultieren, ausreichen um die Luft-Übertragbarkeit von human-adaptierten hochpathogenen aviären H5N1-Viren in Frettchen herzustellen (Herfst *et al.*, 2012; Imai *et al.*, 2012; Imai *et al.*, 2013).

I.3.5 Entstehung von Influenza-Pandemien

Pandemische Influenza-Viren zeichnen sich durch zwei grundlegende Charakteristika aus:

1. Ihre Oberflächenglykoproteine unterscheiden sich deutlich in ihrer Antigenität von den bereits in der menschlichen Bevölkerung zirkulierenden Viren, so dass keine Kreuzimmunität besteht.
2. Aufgrund von erworbenen human-adaptiven Mutationen können die neu in die Bevölkerung eingebrachten Viren sowohl effizient im Menschen replizieren, als auch effizient innerhalb der menschlichen Bevölkerung übertragen werden.

In Folge dieser beiden viralen Charakteristika kommt es zu anhaltenden oder ansteigenden Mensch-zu-Mensch-Übertragungen in der Bevölkerung in mindestens zwei der sechs WHO-Regionen (WHO).

Das Auftreten von Viren, welche sich so deutlich in ihrer Antigenität von den bereits zirkulierenden Viren unterscheiden, dass keine Kreuzimmunität besteht, ruft einen *Antigen shift* hervor, der durch zwei Mechanismen entstehen kann:

Zum einen können pandemische Viren in Folge von wiederholter direkter Übertragung und Adaptation aviärer bzw. tierischer Influenza-A-Viren an den Menschen entstehen. Hierbei entstehen im Zuge der Adaptation im viralen Genom human-adaptive Mutationen, welche sowohl eine effiziente virale Replikation im Menschen, als auch eine effiziente Transmission in der menschlichen Bevölkerung gewährleisten. Dieser Mechanismus wird für die Entstehung der „Spanischen Grippe“ von 1918 diskutiert (I.3.6).

Zum anderen können pandemische Influenza-Viren durch Genreassortierung entstehen. Zur Reassortierung einzelner viraler Gensegmente kommt es, wenn mindestens zwei Viren unterschiedlichen Subtyps die gleiche Zelle eines Organismus infizieren. Dabei kann es während der Replikation zu einer Durchmischung der Gensegmente beider parentaler Viren kommen, was in der Assemblierung von Nachkommenviren resultiert, die eine Kombination der Gensegmente beider parentaler Viren enthalten. Zum *Antigen shift* kommt es dabei ausschließlich dann, wenn von der Reassortierung die beiden Oberflächenglykoproteine HA und NA betroffen sind. Dies war sowohl bei der Entstehung der „Asiatischen Grippe“ von 1957, als auch der „Hong-Kong Grippe“ von 1968 der Fall (Oxford, 2000; Kilbourne, 2006). Allerdings müssen an der Reassortierung nicht notwendigerweise Viren unterschiedlichen Subtyps beteiligt sein, damit es zum *Antigen shift* kommt. Wie die sog. „Pseudopandemie“ von 1947 gezeigt hat, kann auch die Genreassortierung von Viren des gleichen Subtyps zum *Antigen shift* führen, wenn sich ihre Oberflächenglykoproteine deutlich in ihrer Antigenität unterscheiden und aus der Reassortierung Viren hervorgehen, die keine Kreuzimmunität zu den zuvor zirkulierenden Viren aufweisen (Kilbourne *et al.*, 2002). Des Weiteren hat die sogenannte „Schweinegrippe“, welche im Jahr 2009 auftrat und durch ein Virus des Subtyps H1N1 verursacht wurde aufgezeigt, dass eine Pandemie nicht notwendigerweise durch ein Virus mit neuem HA-Subtyp hervorgerufen werden muss (Klenk, 2013). Zur Entstehung einer Pandemie kann die Wiederkehr eines alten Subtyps, gegenüber dem ein Großteil der Bevölkerung immunologisch naiv ist, genügen. Dies war neben der „Schweinegrippe“ auch bei der

„Russischen Grippe“ aus dem Jahr 1977, die ebenfalls durch ein Virus des Subtyps H1N1 verursacht wurde, der Fall. Von beiden Ausbrüchen war hauptsächlich die jüngere Bevölkerung betroffen (Kilbourne, 2006).

I.3.6 Influenza-Pandemien des 20./21. Jahrhunderts

In den letzten 500 Jahren ist es zu mindestens 14 Influenza-Pandemien gekommen, die in unregelmäßigen Abständen zueinander aufgetreten sind und von denen lediglich die letzten vier Pandemien wissenschaftlich gut erfasst sind (Morens *et al.*, 2010; Morens & Taubenberger, 2011). Bei diesen Pandemien handelt es sich um die „Spanische Grippe“ (H1N1) von 1918/1919, die „Asiatische Grippe“ (H2N2) von 1957, die „Hong-Kong Grippe“ (H3N2) von 1968, sowie die 2009 aufgetretene „Schweinegrippe“ (H1N1) (Abb. I.3).

Die „Spanische Grippe“, welche erstmals im März 1918 in Militärlagern in den USA dokumentiert und durch ein Influenza-A-Virus des Subtyps H1N1 verursacht wurde, ging als die schwerste Pandemie in die Medizingeschichte ein. Innerhalb von 12 Monaten breitete sich das Virus über den gesamten Globus aus, infizierte heutigen Schätzungen zu Folge über 500 Millionen Menschen und forderte in den Jahren 1918 und 1919 weltweit etwa 50 Millionen Todesopfer (Steel & Palese, 2008). Die Pandemie trat hierbei in drei Wellen auf. Während die erste pandemische Welle im Frühjahr 1918 mit eher milden Krankheitsverläufen einher ging, war das Virus in den beiden darauffolgenden pandemischen Wellen im Herbst 1918, sowie im Winter 1918/1919 wesentlich virulenter und führte zu schweren Krankheitsverläufen, die in Folge von sekundären bakteriellen Infektionen oftmals tödlich verliefen (Taubenberger & Morens, 2006). Hierbei war besonders auffällig, dass bei dieser Pandemie nicht wie üblich vor allem die ältere Bevölkerung von hohen Mortalitätsraten betroffen war, sondern zudem außergewöhnlich viele junge, gesunde Erwachsene im Alter zwischen 20 und 40 Jahren der Infektion erlagen. Diese machten etwa die Hälfte aller Todesfälle aus (Taubenberger & Morens, 2006; Morens *et al.*, 2010). Die Ursache für dieses Phänomen ist bis heute ungeklärt, allerdings könnte diese sowohl auf den Immunstatus der Bevölkerung (Steel & Palese, 2008), als auch auf einen sog. Zytokinsturm (*Cytokine storm*), wie er im Zusammenhang mit humanen H5N1-Infektionen beobachtet wurde (Morens *et al.*, 2010), zurückzuführen sein.

Da humane Influenza-Viren erstmals 1933 isoliert wurden und somit keine Virusisolate aus den Jahren vor der Pandemie zu Verfügung stehen, bleibt zudem die Frage nach dem Ursprung

der Pandemie bis heute offen. Diesbezüglich hat man lange Zeit angenommen, dass die Pandemie nicht durch Reassortierung, sondern durch direkte Übertragung eines aviären Virus auf den Menschen entstanden ist (Gammelin *et al.*, 1990; Gorman *et al.*, 1991). Allerdings wurden detaillierte Studien zur Entstehung der Pandemie erst möglich, nachdem es Taubenberger und seinen Kollegen im Jahr 2005 gelang, das Genom des Pandemievirus zu rekonstruieren. Nachfolgende phylogenetische Studien zeigten, dass alle acht Gensegmente des Virus am nächsten verwandt zu frühen humanen und porzinen H1N1-Isolaten sind und diese nur eine entferntere Verwandtschaft zu einer evolutionär distinkten Virusgruppe von aviären und porzinen Virusisolaten aufweisen (Anhlan *et al.*, 2011). Basierend auf diesen Erkenntnissen gehen neuere Studien davon aus, dass das Pandemievirus von 1918 entweder von einem porzinen H1N1-Virus abstammt, das seinerseits aviären Ursprungs ist und über längere Zeit in Schweinen zirkulierte (Anhlan *et al.*, 2011), oder dass es sich um eine Reassortante aus einem aviären Virus, sowie zuvor zirkulierenden humanen und porzinen Viren handelt (Smith *et al.*, 2009). Neben den Studien zur Entstehung des pandemischen Virus konnte zudem in pathogenetischen Studien gezeigt werden, dass die hohe Virulenz und Pathogenität dieses Virus hauptsächlich durch die Proteine HA und NA (Kobasa *et al.*, 2004; Tumpey *et al.*, 2004), PB1 (Pappas *et al.*, 2008) und PB1-F2 (McAuley *et al.*, 2007) vermittelt wurden und dass das HA- sowie das PB2-Protein offensichtlich eine wichtige Rolle bei der Übertragbarkeit des Virus spielten (Van Hoeven *et al.*, 2009).

Die Pandemie von 1918 dauerte bis in den Februar 1919 an, bevor das Virus endemisch wurde und die Viren des Subtyps H1N1 bis 1957 in der humanen Bevölkerung zirkulierten.

Im Februar 1957 trat erstmals die „Asiatische Grippe“ in der südchinesischen Provinz Guizhou auf, die durch ein Virus des Subtyps H2N2 verursacht wurde und mit einer Million geforderter Todesopfer wesentlich weniger pathogen als die vorangegangene Pandemie aus dem Jahre 1918 war (Cox & Subbarao, 2000). Das Virus der „Asiatischen Grippe“ entstand durch Reassortierung eines aviären H2N2-Virus mit dem noch in der Bevölkerung zirkulierenden humanen H1N1-Virus. Hierbei wurden die HA-, NA- und PB1-Gensegmente des humanen H1N1-Virus gegen die entsprechenden Gensegmente des aviären H2N2-Virus ausgetauscht (Kilbourne, 2006; Taubenberger & Morens, 2010). Im Verlauf der Adaptation des reassortanten Virus an den Menschen traten im PB1-Protein, die Mutationen V114I, N375S, A401V und R430K auf, die in der Nähe des Kernlokalisierungssignals, sowie zwischen den Polymerasemotiven liegen (Taubenberger *et al.*, 2005). Neben diesen Mutationen sind im HA

die beiden Mutationen G226L und G228S entstanden, welche eine bessere Bindung des Virus an den humanen Rezeptors vermittelten (Connor *et al.*, 1994; Matrosovich *et al.*, 2000). Die Viren des Subtyps H2N2 wurden zwei Jahre nach der Pandemie endemisch und zirkulierten bis 1968 in der humanen Bevölkerung.

Die Pandemie von 1968, die erstmals im Juli 1968 in Hong-Kong auftrat und unter dem Namen „Hong-Kong Grippe“ bekannt ist, wurde durch ein Virus des Subtyps H3N2 verursacht, das aus der Reassortierung eines aviären H3-Virus mit einem noch in der Bevölkerung zirkulierenden humanen H2N2-Virus hervorgegangen ist. Dieses trägt, ähnlich dem pandemischen H2N2-Virus von 1957, neben einem aviären HA- ebenfalls ein PB1-Gensegment aviären Ursprungs, während die restlichen sechs Gensegmente von dem humanen H2N2-Vorläufervirus stammen (Cox & Subbarao, 2000; Taubenberger & Morens, 2010). Auch diese Pandemie ging wie bereits die vorangegangene Pandemie mit einer mäßigen Mortalität einher und forderte weltweit etwa 1 Million Todesopfer. Durch Sequenzanalysen konnte gezeigt werden, dass im PB1-Gensegment die human-adaptiven Mutationen K121R, L212V, R327K und N375S auftraten, deren Beitrag zur Entstehung der Pandemie bislang ungeklärt ist und zum Teil in dieser Arbeit untersucht wurde (Taubenberger *et al.*, 2005). Viren des Subtyps H3N2 cozirkulieren bis heute mit den 2009 aufgetretenen H1N1-Viren in der humanen Bevölkerung und sind momentan zusammen mit den Influenza-B-Viren für die jährlich auftretenden Influenza-Epidemien verantwortlich (http://www.who.int/influenza/surveillance_monitoring/updates/latest_update_GIP_surveillance/en/; abgerufen am 27.06.2014).

Zur ersten Pandemie des 21. Jahrhunderts, bekannt unter dem Namen „Schweinegrippe“ kam es im Jahr 2009. Diese wurde durch ein Virus des Subtyps H1N1 hervorgerufen, das erstmals im Februar 2009 in Mexiko identifiziert wurde und sich innerhalb von sechs Monaten um den gesamten Globus verbreitete. Bei dem neuen pandemischen H1N1 Virus handelte es sich um eine Quadruple-Reassortante, die aus der Reassortierung einer porzinen Triple-Reassortante, die in den 90iger Jahren in nordamerikanischen Schweinepopulationen zirkulierte, und einem eurasischen aviär-ähnlichen Schweinevirus hervorgegangen ist (Smith *et al.*, 2009; Neumann *et al.*, 2009). Diese setzte sich aus dem PB1-Gensegment eines saisonalen, humanen H3N2-Virus, den PA- und PB2-Gensegmente eines nordamerikanischen aviären Virus, den HA-, NP- und NS-Gensegmente eines klassischen H1N1 Schweinevirus, sowie den NA- und M-Gensegmenten eines eurasischen aviär-ähnlichen Schweinevirus zusammen (Neumann *et al.*,

2009; Garten *et al.*, 2009; Smith *et al.*, 2009) (Abb. I.3). Nachfolgend wird dieses Virus entsprechend der Standardisierung der WHO als pandemisches (H1N1) 2009 Virus (pdmH1N1) bezeichnet, um dieses Virus von den vorangegangenen saisonalen humanen H1N1-Viren zu differenzieren. Das pdmH1N1-Virus übertrug sich sehr effizient von Mensch-zu-Mensch, was die WHO am 11.06.2009 dazu veranlasste die Pandemiestufe 6 des WHO-Pandemieplans auszurufen. Im Allgemeinen wies die Pandemie einen eher milden Krankheitsverlauf auf, wobei anzumerken ist, dass es insbesondere unter jungen Erwachsenen und Patienten mittleren Alters gehäuft zu schweren respiratorischen Komplikationen (*Acute Respiratory Distress Syndrome*, ARDS) gekommen ist. Die post-pandemische Phase wurde von der WHO am 10. August 2010 ausgerufen. Seither ist das pdmH1N1-Virus endemisch und cozirkuliert mit Viren des Subtyps H3N2 in der menschlichen Bevölkerung. Dabei hat es die seit 1977 zirkulierenden humanen H1N1-Viren aus der menschlichen Bevölkerung verdrängt. Interessanterweise konnte anhand der Sequenzen der viralen Gensegmente beobachtet werden, dass einige bekannte Wirtszellmarker in der Polymerase, wie die Positionen PB2-627 und PB2-701, immer noch die aviäre Signatur auf, was vermuten ließ, dass das Virus noch nicht voll ständig an den Menschen adaptiert war (Klenk *et al.*, 2011).

Zusammenfassend kann für die vier Pandemien des 20./21. Jahrhundert beobachtet werden, dass zumindest zwei der vier pandemischen Viren ein aviäres PB1-Gensegment trugen. Hierbei war sowohl für die Reassortierung des pandemischen H2N2 Virus von 1957, als auch für die Reassortierung des pandemischen H3N2 Virus von 1968 zu beobachten, dass der Erwerb eines aviären HA-Gensegments in einem Austausch des humanen gegen ein aviäres PB1-Gensegment resultierte (Abb. I.3).

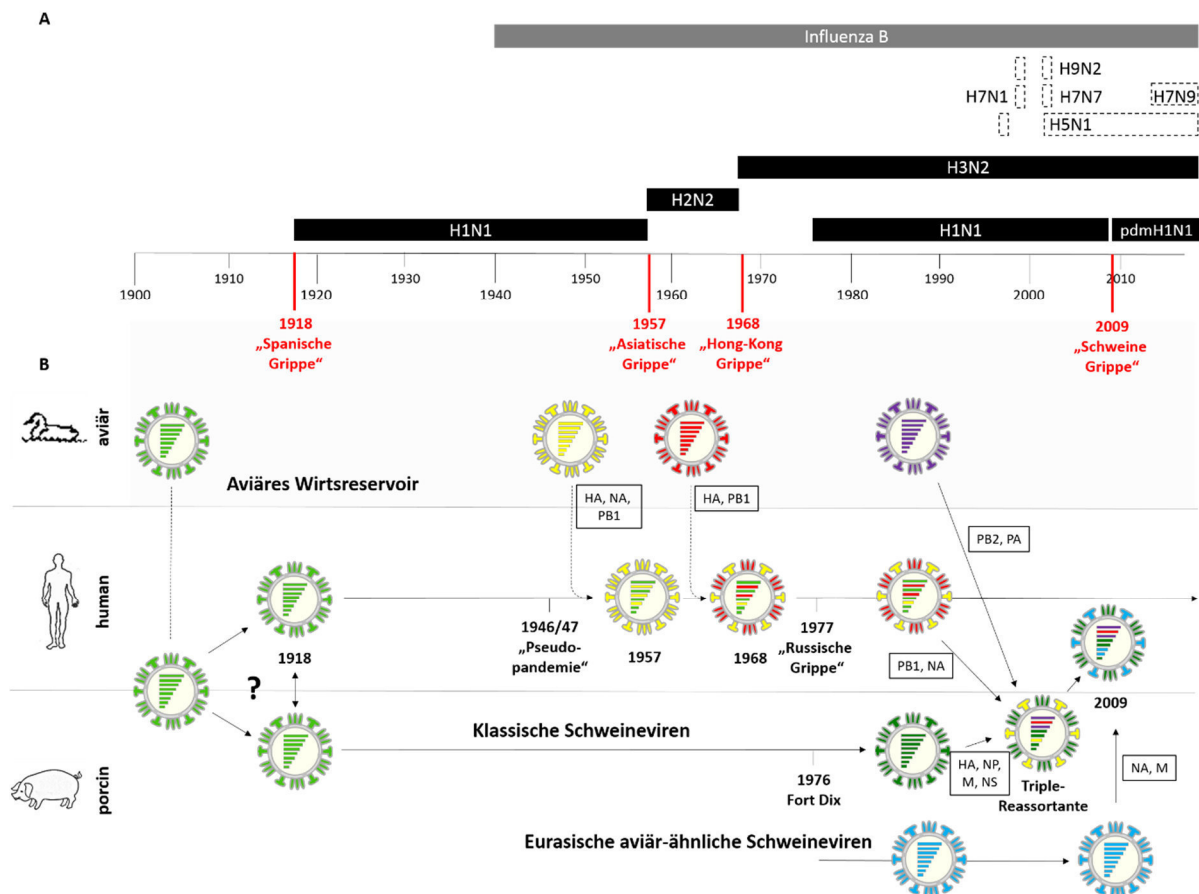


Abb. I.3: Zeitliches Auftreten und Entstehen der Influenza-Pandemien des 20./21. Jahrhunderts. (A) Zeitliches Auftreten der Pandemien des 20./21.Jahrhunderts (rot), sowie der postpandemischen Phasen in denen humane Influenza-A-Viren der Subtypen H1, H2 und H3 (schwarz) mit Influenza-B-Viren (grau) endemisch in der menschlichen Bevölkerung kozirkulierten. Transiente Übertragungen hochpathogener aviärer Influenza-A-Viren der Subtypen H5, H7 und H9 sind gestrichelt dargestellt. Modifiziert nach Cox *et al.*, 2004. **(B)** Schematische Darstellung zur Entstehung der vier pandemischen Influenza-Viren des 20./21.Jahrhunderts. Modifiziert nach Taubenberger & Kash, 2010 und Klenk *et al.*, 2011.

I.4 Das PB1 (polymerase basic 1) Gen und seine Genprodukte

I.4.1 Genomischer Aufbau des PB1-Gensegments

Das PB1-Gensegment (Gensegment 2) weist eine Länge von 2.341 Nukleotiden auf und kodiert für die drei viralen Proteine PB1, PB1-F2 und PB1-N40. Wie alle viralen Gensegmente der Influenza-A-Viren ist auch das PB1-Gensegment in einen kodierenden und einen nicht-kodierenden Sequenzbereich unterteilt (I.1.3 und Abb. I.4).

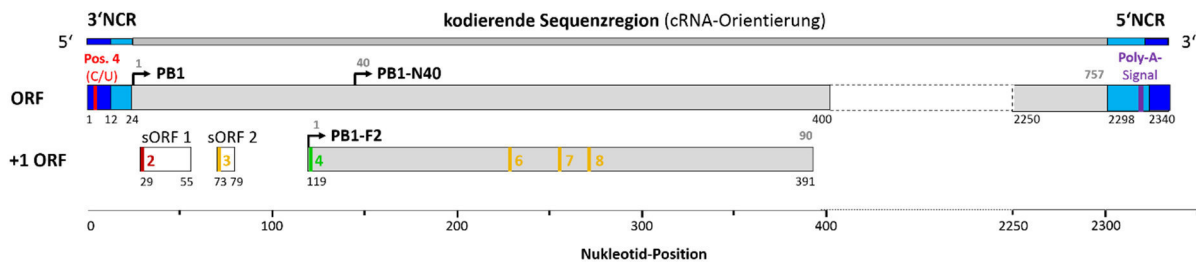


Abb. I.4: Genomische Organisation des PB1-Gensegments. Dargestellt ist das PB1-Gensegment in cRNA-Orientierung (5'-3'), das in einen kodierenden (grau) und nicht-kodierenden Sequenzbereich (blau) unterteilt werden kann. Die nicht-kodierenden Bereiche werden entsprechend ihrer Lokalisation an den Segment-Enden der vRNA als 3' und 5'NCR bezeichnet und untergliedern sich in einen hochkonservierten (dunkelblau) und einen variablen, segment-spezifischen Sequenzbereich (hellblau). Im hochkonservierten Bereich des 3'NCR ist ein C/U-Polymorphismus (rot) enthalten und der variable Bereich des 5'NCR kodiert für das Polyadenylierungssignal (lila). Die Angaben der Nukleotidpositionen beziehen sich auf die PB1-Gensegmente der beiden Virusisolate A/California/1/66 (H2N2) und A/Hong Kong/1/68 (H3N2). Modifiziert nach Wise *et al.*, 2009.

Der kodierende Bereich des PB1-Gensegments umfasst insgesamt 2.274 Nukleotide und kodiert im Bereich der Nukleotide 25 bis 2.297 für das 757 Aminosäuren lange PB1-Protein, das die Funktion der viralen RNA-abhängigen RNA-Polymerase erfüllt. Dieses wird in negativer Orientierung kodiert, erstreckt sich über den gesamten Leserahmen (*Open Reading Frame*; ORF) und wird ausgehend vom ersten Start-Codon des ORF exprimiert. Neben dem PB1-Protein werden zudem die beiden erst kürzlich entdeckten nicht-essentiellen, viralen Proteine PB1-F2 und PB1-N40 kodiert. Während das PB1-F2-Protein, welches die Funktion eines proapoptotischen Virulenzfaktors besitzt, in einem überlappenden Leserahmen (+1-ORF) kodiert und vom vierten Start-Codon exprimiert wird (Chen *et al.*, 2001), stellt das PB1-N40-Protein eine N-terminal verkürzte Variante des PB1-Proteins dar, die vom fünften Start-Codon des ORF exprimiert wird und deren Funktion bislang noch unbekannt ist (Wise *et al.*, 2009). Da sowohl das PB1-F2-Protein, als auch das PB1-N40-Protein von Start-Codons exprimiert werden, die im Gegensatz zu den ersten drei Start-Codons des PB1-Leserahmens in einem starken Translationsinitiations-Kontext stehen, wird angenommen, dass beide Proteine durch unpräzises ribosomales Scannen der mRNA und somit durch „Überlesen“ der ersten drei bzw. vier Start-Codons entstehen (Wise *et al.*, 2009; Wise *et al.*, 2011).

Der nicht-kodierende Bereich des 3'-Endes (*3'non-coding region*; 3'NCR) umfasst 24 Nukleotide und wird auf Grund seiner Sequenzkonservierung zwischen den Gensegmenten und den einzelnen Influenza-Subtypen, in den 12 Nukleotide umfassenden hochkonservierten und den sich daran anschließenden 12 Nukleotide langen, variablen segment-spezifischen

Sequenzbereich unterteilt. Für den hochkonservierten Sequenzbereich wurde beobachtet, dass dieser einen C/U-Polymorphismus an Position 4 aufweist, der sowohl zwischen den Gensegmenten (Robertson, 1979; Desselberger *et al.*, 1980), wie auch zwischen den Virusisolaten variiert (Wang & Lee, 2009). Der nicht-kodierende Bereich des 5'-Endes (5'*non-coding region*; 5'NCR) umfasst 43 Nukleotide - 13 Nukleotide im hochkonservierten und 30 Nukleotide im variablen segment-spezifischen Sequenzbereich und weist im variablen Sequenzbereich das Polyadenylierungssignal für die Transkriptionstermination auf. Beide NCR's sind partiell komplementär zueinander und enthalten alle regulatorischen Signale für die Transkriptions- und Replikationsinitiation. Daher dienen die NCR-Sequenzen dem viralen Polymerasekomplex als Promotor für die Replikation des Gensegments.

I.4.2 Struktur und Funktion des PB1-Proteins

Innerhalb des viralen Polymerasekomplexes, der eine sehr kompakte, aber dennoch flexible Struktur aufweist (Area *et al.*, 2004; Torreira *et al.*, 2007), kommt der PB1-Untereinheit eine zentrale Rolle zu. Diese besitzt die katalytische Aktivität einer RNA-abhängigen RNA-Polymerase und ist somit für die RNA-Synthese während der viralen Replikation und Transkription verantwortlich (Poch *et al.*, 1989; Biswas & Nayak, 1994). Um diese Funktion erfüllen zu können, vermittelt die PB1-Untereinheit zudem die Bindung des viralen Polymerasekomplex an cRNA- und vRNA-Promotoren (Li *et al.*, 1998; González & Ortín, 1999; Jung & Brownlee, 2006), besitzt eine Initiator-Nukleotidbindestelle für die Replikationsinitiation (Kolpashchikov *et al.*, 2004) und spielt eine wesentliche Rolle bei der Zusammenlagerung der Untereinheiten des Polymerasekomplexes (Digard *et al.*, 1989).

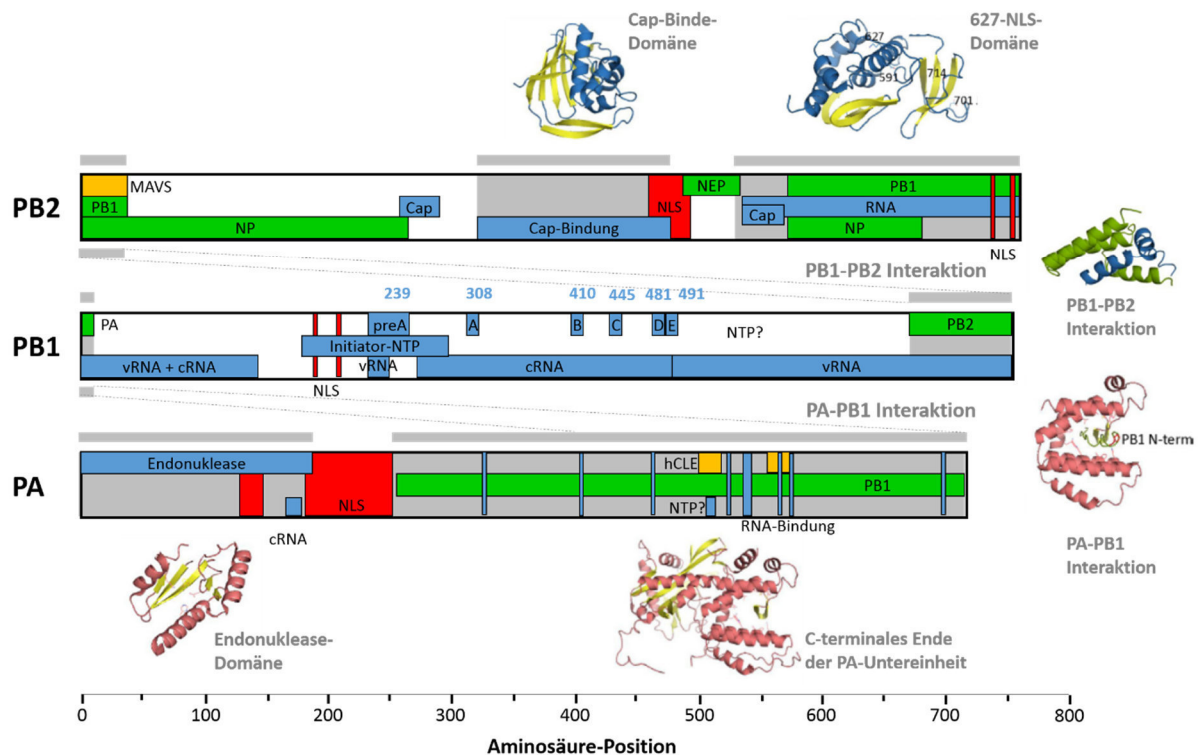


Abb. I.5: Organisation des viralen RNA-abhängigen RNA-Polymerasekomplexes. Dargestellt ist die Organisation der Polymerase-Untereinheiten PA, PB1 und PB2 im viralen Polymerasekomplex. Die PA-PB1- und PB1-PB2-Interaktionen sind durch **graue, gestrichelte Linien** dargestellt. Die funktionellen Domänen der Untereinheiten sind entsprechend ihrer Funktion farblich markiert: **grün**= Interaktionsdomänen mit anderen viralen Proteinen; **rot**= Kernlokalisationssignale; **orange**= Interaktionsdomänen für zelluläre Proteine; **blau**= RNA-Bindedomänen. Die Aminosäurepositionen für die viralen Polymerasemotive in der PB1-Untereinheit sind durch **blaue Zahlen** angegeben. Die Polymerasebereiche mit bekannter Kristallstruktur sind **grau unterlegt**. Modifiziert nach Gabriel *et al.*, 2013 und Mänz *et al.*, 2013).

Die PB1-Untereinheit stellt die zentrale Untereinheit des viralen Polymerasekomplex dar. Diese interagiert N-terminal mit der PA-Untereinheit und C-terminal mit der PB2-Untereinheit (Abb. I.5). Hierbei wird die PA-PB1 Interaktion durch hydrophobe Aminosäurereste (Aminosäuren 6-12) der N-terminalen Domäne der PB1-Untereinheit und der C-terminalen Domäne (Aminosäuren 257-716) der PA-Untereinheit vermittelt (He *et al.*, 2008; Obayashi *et al.*, 2008). Die Interaktion der PB1- mit der PB2-Untereinheit wird hingegen durch die Aminosäuren 678-757 am C-Terminus der PB1-Untereinheit und die Aminosäuren 1-37 am N-Terminus der PB2-Untereinheit vermittelt (Poole *et al.*, 2004; Sugiyama *et al.*, 2009). Hierbei kommt diese Interaktion durch Wasserstoffbrückenbindungen, sowie vier ionischen Bindungen zwischen den Aminosäuren PB1-K698 und PB2-E2, PB2-R3, PB2-E6, sowie PB1-D725 und PB2-R3 zu Stande (Sugiyama *et al.*, 2009). Eine Interaktion zwischen den Untereinheiten PB2 und PA konnte bislang nicht festgestellt werden, allerdings ist es auf

Grund der sehr komplexen Struktur des Polymerasekomplexes möglich, dass auch zwischen diesen beiden Untereinheiten Interaktionen bestehen (Hemerka *et al.*, 2009).

Die Untereinheiten des viralen Polymerasekomplexes erfüllen unterschiedliche Funktionen bei der Transkription und Replikation des viralen Genoms (Abb. I.5). Während die PB2-Untereinheit die Bindung des Polymerasekomplexes an zelluläre Cap-Strukturen vermittelt (Fechter *et al.*, 2003; Guilligay *et al.*, 2008) und die PA-Untereinheit durch ihre Endonukleasedomäne die Cap-Strukturen von zellulären prä-mRNAs abspaltet (Dias *et al.*, 2009; Yuan *et al.*, 2009), besitzt die PB1-Untereinheit die katalytische Aktivität einer RNA-abhängigen RNA-Polymerase (Poch *et al.*, 1989; Biswas & Nayak, 1994).

Während in den letzten Jahren große Teile der PB2- und PA-Untereinheiten strukturell erfasst wurden, sind für die PB1-Untereinheit mit Ausnahme der PA-PB1- (He *et al.*, 2008; Obayashi *et al.*, 2008) und PB1-PB2-Interaktionsdomänen (Sugiyama *et al.*, 2009) bislang keine strukturellen Details bekannt. Dementsprechend wurden die hochkonservierten Polymerasemotive, welche das katalytische Zentrum der Polymerasedomäne bilden, bislang lediglich anhand vergleichender Sequenzanalysen vorhergesagt. Diese sind um die Aminosäurepositionen 239, (pre-A-Motiv), 308 (A-Motiv), 410 (B-Motiv), 445 (C-Motiv), 481 (D-Motiv) und 491 (E-Motiv) lokalisiert und liegen in allen viralen RNA-abhängigen RNA-Polymerasen, sowie RNA-abhängigen DNA-Polymerasen hochkonserviert vor (Biswas & Nayak, 1994; Müller *et al.*, 1994; Leahy *et al.*, 1997).

Neben den beschriebenen Polymerasemotiven muss der Polymerasekomplex zudem Nukleosidtriphosphat- (NTP), sowie cRNA- und vRNA-Bindestellen aufweisen, um erfolgreich das virale Genom replizieren zu können. Während die Initiator-Nukleotidbindestelle mittels Vernetzungsstudien auf der PB1-Untereinheit im Bereich der Aminosäuren 179 und 297 lokalisiert werden konnte (Kolpashchikov *et al.*, 2004), gibt es für die NTP-Bindestellen Hinweise, dass diese sowohl auf der PB1- (Romanos & Hay, 1984; Asano *et al.*, 1995) als auch auf der PA-Untereinheit (de la Luna *et al.*, 1989) lokalisiert sein könnten. Des Weiteren wurden für die PB1-Untereinheit cRNA- und vRNA-Bindestellen beschrieben. Während die cRNA-Bindestellen im N-terminalen Bereich (Aminosäuren 1-139), sowie im Bereich der Aminosäuren 267-493 lokalisiert wurden, befinden sich die vRNA-Bindestellen sowohl im N-terminalen (Aminosäuren 1-139) und C-terminalen Bereich (González & Ortín, 1999; Li *et al.*, 1998), sowie im Bereich der Aminosäuren 233-249 (Jung & Brownlee, 2006).

I.4.3 PB1-F2

Das PB1-F2-Protein, das im Jahr 2001 bei der Suche nach Influenza-A Epitopen, die von CD8+ T-Lymphozyten erkannt werden, entdeckt wurde, stellt ein für die virale Replikation nicht-essentielles Nichtstrukturprotein dar, das ausschließlich in infizierten Zellen detektiert werden kann und eine Länge von 87 bzw. 90 Aminosäuren aufweist (Chen *et al.*, 2001). Bei diesem handelt es sich um einen proapoptotischen Virulenzfaktor, der aufgrund proinflammatorischer und Zelltyp-spezifischer proapoptotischer Eigenschaften, die Pathogenität von Viren erhöht (Chakrabarti & Pasricha, 2013). Allerdings ist hierbei anzumerken, dass die Funktion des PB1-F2-Proteins, aufgrund seiner Kodierung im +1-Leserahmen und der mit der Degenerierung des genetischen Codes einhergehenden Sequenzvariabilität, sehr komplex ist. Dementsprechend sind die meisten pathogenen Eigenschaften des PB1-F2-Proteins Virusstamm-, Zelltyp- und/oder Wirts-spezifisch (Hai *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2010; McAuley *et al.*, 2010a; McAuley *et al.*, 2010b; Schmolke *et al.*, 2011). Zudem werden diese von Interaktionen mit anderen viralen Proteinen, wie auch von Wirtszellprotein-Interaktionen beeinflusst (Košík *et al.*, 2013). In diesem Zusammenhang ist des Weiteren zu erwähnen, dass nicht alle Influenza-A-Viren ein PB1-F2-Protein der vollen Länge kodieren. Insbesondere klassische Schweineviren und das pandemische H1N1-Virus von 2009, sowie humane H1N1 Virusisolate, die nach 1949 isoliert wurden, weisen verkürzte PB1-F2-Proteine mit einer Länge von 11, 25 und 34 bzw. 57 Aminosäuren auf. Im Gegensatz dazu kodieren die pandemischen Viren von 1918, 1957 und 1968, sowie über 94% der humanen H2N2 und H3N2-Isolate für ein PB1-F2-Protein, das die volle Länge von 87 bis 90 Aminosäuren besitzt (Zell *et al.*, 2007; Pasricha *et al.*, 2013).

Die durch das PB1-F2-Protein vermittelte Pathogenität kann in eine durch das Wirtsimmunsystem-induzierte Pathogenität und eine Virus-induzierte Pathogenität unterteilt werden. Hierbei spielen bei der durch das Wirtsimmunsystem induzierten Pathogenität, sowohl die proapoptotischen, wie auch die proinflammatorischen Eigenschaften des PB1-F2-Proteins eine Rolle. Bezüglich der proapoptotischen Eigenschaften wurde von Chen *et al.* beschrieben, dass die durch das PB1-F2-Protein induzierte Apoptose in Immunzellen, wie antigenpräsentierenden alveolaren Makrophagen und dendritischen Zellen, wesentlich ausgeprägter ist als in Epithelzellen (Chen *et al.*, 2001; Coleman, 2007). Diese Beobachtung führte zu der Hypothese, dass es durch die selektive Immunzell-Apoptose zu einer

verlangsamten Bekämpfung der viralen Infektion durch das Immunsystem und somit zu einer gesteigerten Pathogenität in Mäusen kommen kann (Zamarin *et al.*, 2006).

Die Apoptose wird hierbei durch die Leucin-reiche C-terminale Domäne des PB1-F2-Proteins, welche im Bereich der Aminosäuren 65-87 das „*Mitochondriale Targeting Signal*“ (MTS) enthält (Gibbs *et al.*, 2003), induziert. Hierfür vermittelt das MTS entweder eine Interaktion mit verschiedenen mitochondrialen Proteinen (Zamarin *et al.*, 2005; McAuley *et al.*, 2010b) oder die Oligomerisierung der in die Mitochondrienmembran eingelagerten PB1-F2-Proteine (Yamada *et al.*, 2004; Chanturiya *et al.*, 2004; Henkel *et al.*, 2010). Beide Mechanismen führen zu einer Porenbildung in der Mitochondrienmembran, die in Folge von Cytochrom-c-Freisetzung zur Apoptose führt.

Neben den proapoptotischen Eigenschaften, beeinflussen auch die proinflammatorischen Eigenschaften des PB1-F2 wesentlich die Pathogenität von Influenza-Viren. So wurde von McAuley *et al.* beschrieben, dass die C-terminale Domäne der PB1-F2-Proteine von den drei pandemischen Viren (1918, 1957 und 1968), sowie hochpathogener H5N1-Viren eine Entzündungsreaktion in der Lunge von Mäusen induziert, die zu einer erhöhten Infiltration von T-Zellen, dendritischen Zellen, Makrophagen und Neutrophilen führt und mit einer erhöhten Pathogenität einhergeht (McAuley *et al.*, 2010b). Diesbezüglich konnten zudem Alymova *et al.* und Conenello *et al.* zeigen, dass insbesondere die in der C-terminalen Domäne lokalisierten Aminosäuren P62L, H75R, Q79R und S82L im pandemischen HK68-Virus, T68I, Q69L und G70V im Virusstamm PR8, sowie die Mutation N66S in hoch-pathogenen H5N1-Viren und im pandemischen Virus von 1918 in einer erhöhten Pathogenität resultieren, die mit erhöhten Cytokin-Leveln, sowie einer verstärkten Infiltration von Immunzellen in die Lungen einhergehen und zu erheblichen Schädigungen des Lungengewebes führen (Conenello *et al.*, 2007; Conenello *et al.*, 2011; Alymova *et al.*, 2011; Alymova *et al.*, 2014).

Zusätzlich zu der durch das Wirtsimmunsystem induzierten Pathogenität kann die Pathogenität eines Virus auch in Folge einer erhöhten viralen Polymerase-Aktivität gesteigert werden. Diesbezüglich konnte Mazur *et al.* in vitro zeigen, dass das PB1-F2-Protein sowohl mit dem PB1-Protein im Zellkern kolokalisiert, als auch die virale Polymerase-Aktivität erhöht. Die Autoren vermuten, dass das PB1-F2-Protein durch Interaktion mit dem PB1-Protein, dieses in der späten Phase des viralen Replikationszyklus im Zellkern zurückhalten und somit die virale Replikation des viralen Genoms verlängern könnte (Mazur *et al.*, 2008).

Die hier für das PB1-F2-Protein beschriebenen pathogenen Eigenschaften wurden zudem oftmals mit einem verstärkten Auftreten von sekundären bakteriellen Infektionen assoziiert (McAuley *et al.*, 2007). Hier besteht die Hypothese, dass die durch das PB1-F2-Protein induzierten Immunreaktionen zu weiteren Nekrosen, der bereits durch die virale Infektion vorgeschädigten Mukus-produzierenden Epithelien führen, wodurch Infektionen mit opportunistischen Bakterien begünstigt werden.

I.4.4 PB1-N40

Das erst kürzlich entdeckte PB1-N40-Protein stellt eine N-terminal verkürzte Variante des PB1-Proteins dar, das 5% des Gesamt-PB1 Anteils in infizierten Zellen ausmacht und dem auf Grund der Deletion der ersten 39 Aminosäuren die PA-PB1-Interaktionsdomäne fehlt (Wise *et al.*, 2011). Da das PB1-Protein zusammen mit PA als Dimer in den Kern importiert wird, ist das PB1-N40-Protein hauptsächlich im Cytoplasma lokalisiert und weist zudem auf Grund der fehlenden Endonukleaseaktivität keine Transkriptaseaktivität auf. Zudem konnte gezeigt werden, dass es sich bei dem PB1-N40-Protein um ein nicht-essentielles virales Protein handelt, dessen Deletion dennoch zu einer Attenuation der viralen Replikation führt (Wise *et al.*, 2009). Dies deutet daraufhin, dass das PB1-N40-Protein einen positiven Effekt auf die virale Replikation hat. Worin dieser Effekt jedoch besteht und ob PB1-N40 möglicherweise eine regulatorische Funktion bei der Expression von PB1 und PB1-F2 zukommt, gilt es in Zukunft zu klären.

I.4.5 Einfluss des PB1-Gensegments auf die Pathogenität und Virulenz von Influenza-A-Viren

Die Pathogenität von Influenza-Viren ist sehr komplex und wird sowohl durch das Zusammenwirken der viralen Proteine, als auch durch deren Interaktion mit zellulären Wirtsfaktoren bestimmt. Wichtige Determinanten der viralen Pathogenität stellen hierbei die beiden Oberflächenglykoproteine HA und NA dar, deren antigene Eigenschaften den Viren ermöglichen der humanen Immunantwort zu entgehen. Neben diesen kommt hierbei insbesondere dem PB1-Protein eine wichtige Rolle zu. So konnte Pappas *et al.* zeigen, dass das Einbringen der einzelnen Gensegmente HA, NA und PB1 des pandemischen Virus von 1918 in das saisonale H1N1-Virus A/Tx/36/91 (Tx91) sowohl dessen Replikationseffizienz, wie auch Virulenz erheblich steigert (Pappas *et al.*, 2008). In einer ähnlichen Studie wurden Einzelgen-

Reassortanten zwischen dem pandemischen Virus von 1918 und dem saisonalen H1N1-Virus A/Kawasaki/173/2001 hergestellt. In dieser Studie wurde beschrieben, dass die Einzelgen-Reassortante, welche das PB1-Gensegment des pandemischen 1918-Virus im Hintergrund des saisonalen H1N1-Virus trägt, ähnlich dem pandemischen 1918-Wildtypvirus die Fähigkeit besitzt, im unteren Respirationstrakt von Frettchen zu replizieren und damit einhergehend die Pathogenität des Virus zu erhöhen (Watanabe *et al.*, 2009). Daneben wurde von Chen *et al.* mittels reverser Genetik gezeigt, dass von 63 Reassortanten, welche ausgehend von dem humanen H3N2-Isolat A/Wyoming/3/2003 und dem hochpathogenen aviären H5N1-Isolat A/Thailand/16/2004 hergestellt wurden, interessanterweise diejenige Reassortante, welche analog zu dem Pandemievirus von 1957 ein aviäres HA-, NA- und PB1-Segment des hochpathogenen H5N1- Isolats trug, eine der höchsten Pathogenitäten für Mäuse aufwies. Die Beobachtung, dass in dieser Studie die Reassortante, welche lediglich die aviären Oberflächenglykoproteine HA und NA enthielt, eine verminderte Pathogenität gegenüber der Reassortante mit aviärem HA, NA und PB1 aufwies, deutet daraufhin dass das aviäre PB1-Protein wesentlichen Einfluss auf die Pathogenität von Reassortanten nimmt (Chen *et al.*, 2008).

Obwohl in allen drei Studien deutlich gezeigt werden konnte, dass das Einbringen eines aviären PB1-Gensegments in ein humanes Virus dessen Pathogenität und Virulenz deutlich steigern und ebenfalls die Replikationseffizienz der Viren erhöhen kann, ist bislang weder bekannt welcher Mechanismus, noch welche Domäne bzw. Aminosäureposition im PB1-Protein für die Pathogenitätssteigerung verantwortlich ist. Bezüglich des zugrundeliegenden Mechanismus, kann spekuliert werden, ob möglicherweise das aviäre PB1 in Folge einer erhöhten Polymerase-Aktivität die Pathogenität und Replikationseffizienz pandemischer Influenza-Viren erhöht.

I.4.6 Einfluss des PB1-Gensegments auf das Wirtsspektrum der Influenza-A-Viren

Während für die Proteine PB2, PA und NP bereits einige wichtige Determinanten des Wirtsspektrums und der Pathogenität beschrieben wurden, sind bislang nur sehr wenige wirtsadaptive Mutationen für das PB1-Protein bekannt. Dies ist vor allem in der Funktion des PB1-Proteins begründet, das eine sehr hohe Sequenzkonservierung in seinen funktionellen Domänen aufweist, um seine Funktion als RNA-abhängige RNA-Polymerase erfüllen zu

können. Aufgrund dessen ist das PB1-Gensegment in seiner Evolution eingeschränkt und weist mit $2,86 \times 10^{-3}$ Substitutionen pro Aminosäureposition und Jahr im Vergleich zu den übrigen Komponenten des vRNP-Komplex (PB2: $3,15 \times 10^{-3}$, PA: $3,48 \times 10^{-3}$ und NP: $3,17 \times 10^{-3}$ Substitutionen pro Position und Jahr) eine verringerte Evolutionsrate auf (Chen *et al.*, 2006; Naffakh *et al.*, 2008). Durch einen Vergleich der PB1-Sequenzen der pandemischen Viren von 1918, 1957 und 1968 mit der aviären Konsensussequenz, konnte Taubenberger *et al.* zeigen dass sich die PB1-Proteine der pandemischen Viren von 1957 und 1968 in vier, und das PB1-Protein des pandemischen Virus von 1918 sich in sieben adaptiven Mutationen von der aviären Konsensussequenz unterscheidet. Die hierbei beobachteten Mutationen waren größtenteils in den vRNA- und cRNA-Bindestellen, in der Nähe des Kernlokalisierungssignals sowie zwischen den Polymerasemotiven lokalisiert. Von diesen Mutationen trat lediglich die Mutation N375S in allen drei PB1-Proteinen der pandemischen Viren auf (Taubenberger *et al.*, 2005). Dementsprechend wurde diese Mutation wiederholt als mögliche Wirtsdeterminante diskutiert. So wurde gezeigt, dass es bei der Adaptation porziner Viren an den Menschen ebenfalls an dieser Position zu der Mutation PB1-G375S kommen kann (Kawaoka *et al.*, 1989). An anderer Stelle wurde postuliert, dass die Mutation PB1-N375S, welche zwischen den hochkonservierten Polymerasemotiven A und B, sowie in der cRNA-Bindestelle liegt, für eine Erhöhung der Polymerase-Genauigkeit verantwortlich sein könnte (Wong *et al.*, 2011). Ob es sich bei dieser Mutation jedoch wirklich um eine Determinante des viralen Wirtsspektrums handelt ist fraglich, da diese Position in aviären Viren nur wenig konserviert vorliegt (Chen *et al.*, 2006). Während die meisten humanen Isolate an dieser Position ein Serin aufweisen, kodieren an selber Position lediglich 66% der aviären Isolate für ein Asparagin, während 12% für ein Threonin und 18% wie die humanen Isolate für ein Serin kodieren (Taubenberger *et al.*, 2005).

Neben dieser Mutation wurde von Xu *et al.* beschrieben, dass das aviäre PB1 des hochpathogenen aviären H5N1-Virus A/Cambodia/P0322095/2005 die Polymerase-Aktivität des durch die Mutation PB2-K627E attenuierten humanen H1N1-Virus A/WSN/33 in Säugerzellen erhöht. Für die Erhöhung der Polymerase-Aktivität waren die beiden Mutationen PB1-L473V und PB1-L598P verantwortlich, für die beobachtet wurde, dass diese hinsichtlich ihres Einflusses auf die Polymerase-Aktivität und die virale Replikationseffizienz das Fehlen der Mutation PB2-E627K kompensieren können. Interessanterweise konnte in dieser Studie zudem für die zwischen den Polymerasemotiven C und D lokalisierte Mutation PB1-L473V

gezeigt werden, dass diese Mutation in den pandemischen H1N1-Viren von 2009 konserviert vorliegt und für die hohe Polymerase-Aktivität des A/California/07/2009 verantwortlich ist (Xu *et al.*, 2012).

In Hinblick auf die Entstehung der Pandemie von 1968 deutet die Studie von Xu *et al.* erneut darauf hin, dass das aviäre PB1 des pandemischen HK68-Virus, möglicherweise in Folge spezifischer Aminosäuresubstitutionen, eine erhöhte Polymerase-Aktivität besessen und somit dem pandemischen Virus einen replikativen Vorteil unterbreitet haben könnte.

Daneben könnte entsprechend der Studie von Wong *et al.*, 2011 auch die Polymerase-Genauigkeit bei der Entstehung der Pandemie eine Rolle gespielt haben. Diesbezüglich wurde von Stich *et al.* postuliert, dass nicht optimal an den Wirt angepasste Viruspopulationen, wie Reassortanten, von geringen Polymerase-Genauigkeiten profitieren. Diese ermöglichen der Viruspopulation breite Quasispezies-Diversitäten auszubilden und sich somit effizient an den neuen Wirt zu adaptieren (Stich *et al.*, 2010).

I.4.7 Die Rolle des PB1-Gensegments bei der Entstehung von Influenza-Pandemien

Obwohl zwei der vier pandemischen Influenza-Viren des 20./21. Jahrhunderts neben einem aviären HA-, ebenfalls ein PB1-Gensegment aviären Ursprungs tragen (Taubenberger & Kash, 2010), ist bislang ungeklärt ob bzw. welche Rolle dem aviären PB1 bei der Entstehung pandemischer Influenza-Viren zukommt. Während Taubenberger & Kash postulieren, dass das PB1-Gen keine signifikante Wirtszellrestriktion aufweist und auf Grund dessen ein aviäres PB1 ohne vorherige Adaptation ein humanes PB1 ersetzt kann (Taubenberger & Kash, 2010), wird in anderen Publikationen beschrieben, dass das aviäre PB1 entweder seinerseits (Naffakh *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2009) oder durch bislang nicht näher charakterisierte Interaktionen mit dem homologen HA (Kawaoka *et al.*, 1989) den pandemischen Viren einen replikativen Vorteil unterbreitet. Hierbei könnte das aviäre PB1-Gensegment durch drei Mechanismen zur Entstehung pandemischer Influenza-Viren beitragen:

- 1.) Das aviäre PB1-Gensegment könnte die virale Polymerase-Aktivität erhöhen und somit die virale Replikationseffizienz steigern (Naffakh *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2009; Xu *et al.*, 2012).

- 2.) Durch das Einbringen eines aviären PB1 in einen humanen Polymerasekomplex könnte es aufgrund nicht optimal aneinander angepasster Polymeraseproteine zu einer zeitweiligen Reduktion der Polymerase-Genauigkeit kommen, die ihrerseits zu einer breiteren Quasispezies-Diversität führen und somit in einer schnelleren Adaptation der Reassortante an den Menschen resultieren könnte (Scholtissek *et al.*, 1993; Ludwig *et al.*, 1995; Kang *et al.*, 2010; Wong *et al.*, 2011).
- 3.) Aufgrund von möglicherweise bestehender HA-PB1-Interaktionen könnte das aviäre PB1-Gensegment nach Reassortierung effizienter in reassortante Viren verpackt werden (Chen *et al.*, 2008; Fournier *et al.*, 2012; Noda *et al.*, 2012).

Bezüglich der ersten Hypothese wurde bereits in zwei Publikationen, in denen die Kompatibilität der Polymerase-Untereinheiten von hochpathogenen aviären H5N1 und H7N1-Viren mit denen der humanen H1N1 Laborstämme A/WSN/33 (WSN) und A/Puerto Rico/8/34 (PR8) getestet wurde, beschrieben, dass das Einbringen eines aviären PB1-Proteins in den Polymerasekomplex eines humanen Virus, sowohl dessen Polymerase-Aktivität beträchtlich steigert, wie auch zu einem geringeren Anteil dessen Replikationseffizienz in Säugerzellen erhöht (Naffakh *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2009). Diese Daten wurden erst kürzlich durch Xu *et al.* validiert, die ebenfalls zeigen konnten, dass das Einbringen eines aviären PB1 von einem hochpathogenen aviären H5N1-Virus in den humanen Polymerasekomplex von WSN, dessen Polymerase-Aktivität, wie auch dessen Replikationseffizienz in Säugerzellen etwa 10-fach steigert. Für diesen Effekt waren die beiden Mutationen PB1-L473V und PB1-L598P verantwortlich, für die zudem gezeigt werden konnte, dass diese das Fehlen der pathogenitätssteigernden Mutation PB2-E627K zumindest in Hinblick auf die virale Replikationseffizienz kompensieren können (Xu *et al.*, 2012). Die Tatsache, dass Li *et al.* zudem beobachten konnte, dass die durch das aviäre PB1 stark erhöhte Polymerase-Aktivität mit einer starken Cytokin-Expression durch humane Makrophagen und Pneumocyten korreliert, deutet darauf hin, dass durch das Einbringen eines aviären PB1 in ein humanes Virus nicht nur dessen Polymerase-Aktivität und Replikationseffizienz, sondern auch dessen Pathogenität gesteigert werden kann.

Ein weiterer Faktor der bei der Entstehung pandemischer Influenza-Viren eine Rolle spielen könnte ist die Genauigkeit mit der die virale Polymerase das virale Genom repliziert. Diesbezüglich hat Scholtissek bereits 1993 postuliert, dass eine herabgesetzte Polymerase-

Genauigkeit notwendig sein könnte, um einem neu in Säugetiere eingebrachten aviären Influenza-Virus eine schnelle Adaptation an die neue Wirtsspezies und somit die Ausbildung einer neuen Viruslinie zu ermöglichen (Scholtissek *et al.*, 1993). Diese Hypothese wird durch die Publikationen von Mansky & Cunningham, 2000, sowie Stich *et al.*, 2010 gestützt.

Hierzu konnte für die aviär-ähnlichen Schweineviren, die 1979 aus der Übertragung eines aviären Virus auf nordeuropäische Schweinepopulationen hervorgegangen sind, gezeigt werden, dass frühe Isolate dieser Viren eine erhöhte Evolutionsrate ihrer Oberflächenglykoproteine, wie auch der internen Gene aufwiesen und sich daher sehr stark hinsichtlich ihrer Epitope und Plaquemorphologie voneinander unterschieden (Ludwig *et al.*, 1995). Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass die aviären Viren welche in die Schweinepopulation übertragen wurden, eine verringerte Polymerase-Genauigkeit aufgewiesen haben müssen, die es den Viren ermöglicht hat, die Wirtsbarriere in Folge einer breiteren Quasispezies-Diversität leichter zu überwinden und sich an die Schweinepopulation zu adaptieren. Interessanterweise wurde ähnliches für den A/Fujian/411/2002 (H3N2) Virusstamm beobachtet, der den zuvor in der menschlichen Bevölkerung zirkulierenden A/Sydney/5/97 (H3N2) Virusstamm verdrängt hat und seit 2002 den in der menschlichen Bevölkerung dominierenden H3N2-Virusstamm darstellt. Die Bestimmung der Mutationsrate einzelner Fujian-Virusisolate aus den Jahren 2003, 2004 und 2005 zeigte, dass das Virusisolat aus dem Jahr 2003 eine dreifach erhöhte Mutationsfrequenz gegenüber den Virusisolaten aus den Jahren 2004 und 2005 aufwies (Wong *et al.*, 2011). Diese Daten, wie auch die Beobachtung, dass die HAs von H3N2-Viren aus den Jahren 2001 und 2002 eine erhöhte und nach 2003 eine reduzierte Evolutionsrate aufwiesen (Kang *et al.*, 2010), deuten darauf hin, dass auch der Fujian-Virusstamm auf Grund einer kurzzeitig reduzierten Polymerase-Genauigkeit eine breitere Quasispezies-Diversität ausbilden und sich in Folge dessen besser an den Menschen adaptieren konnte.

Da breite Quasispezies-Diversitäten das Überwinden von Wirtsbarrieren erleichtern, besteht die Möglichkeit, dass Viruspopulationen welche auf Grund herabgesetzter Polymerase-Genauigkeiten eine breite genomische Diversität ausbilden können, mit zu der Entstehung von Pandemien beitragen.

Für die Viren der Pandemien von 1957 und 1968 wurde beobachtet, dass beide ein HA- und PB1-Gensegment aviären Ursprungs aufweisen (Taubenberger & Kash, 2010). Daher besteht die Hypothese, dass bei der Entstehung pandemischer Influenza-Viren das aviäre PB1-

Gensegment, möglicherweise in Folge von HA-PB1-Interaktionen effizienter in Reassortanten inkorporiert wird. Diesbezüglich konnte mittels Elektronentomographie gezeigt werden, dass die Gensegmente aufgrund von Basenpaarungen der Verpackungssignale als supramolekulare Komplexe in Virionen inkorporiert werden (Fournier *et al.*, 2012a; Fournier *et al.*, 2012b; Gavazzi *et al.* 2013). Hierbei sind die vier längsten Gensegmente (PB2, PB1, PA und HA) stets mittig im supramolekularen Komplex in einem spezifischen Muster angeordnet (Noda *et al.*, 2012), was auf mögliche Interaktionen zwischen diesen Gensegmenten schließen lässt. Des Weiteren wurden nicht nur in verschiedenen Publikationen immer wieder mögliche HA-PB1-Interaktionen postuliert (Kawaoka *et al.*, 1989; Zhou *et al.*, 1999; Karasin *et al.*, 2000; Horimoto & Kawaoka, 2005), sondern in verschiedenen Reassortierungs-Studien konnte zudem wiederholt gezeigt werden, dass Viren die ein HA, NA und PB1 gleichen Ursprungs (5+3 Reassortanten) tragen effizienter replizieren und reassortiert werden, als Viren die lediglich ein HA und NA gleichen Ursprungs (6+2 Reassortanten) besitzen (Rudneva *et al.*, 2007; Wanitchang *et al.*, 2010; Fulvini *et al.*, 2011; Ramanunninair *et al.*, 2013; Cobbin *et al.*, 2013; Chen *et al.*, 2008).

Somit könnten neben einer erhöhten Polymerase-Aktivität und einer reduzierten Polymerase-Genauigkeit auch HA-PB1-Interaktionen bei der Entstehung von Influenza-Pandemien eine Rolle spielen. Ob bzw. welche der hier beschriebenen Mechanismen zur Entstehung pandemischer Viren beitragen, gilt es in dieser Arbeit sowie in Zukunft zu klären, um pandemische Influenza-Viren frühzeitig erkennen und ihrer Ausbreitung in der menschlichen Bevölkerung rechtzeitig entgegen wirken zu können.

I.5 Fragestellung und Zielsetzung

Die Viren der Pandemien von 1957 und 1968 sind durch Reassortierungen zwischen aviären und humanen Influenza-Viren entstanden (Taubenberger & Kash, 2010). Mittels phylogenetischer Studien konnten Kawaoka *et al.* zeigen, dass beide pandemischen Viren neben einem aviären HA-Gensegment, ebenfalls ein PB1-Gensegment aviären Ursprungs tragen (Kawaoka *et al.*, 1989). Für das HA ist seit langem bekannt, dass Änderungen in dessen immunogenen Eigenschaften wichtige Voraussetzungen für die Entstehung pandemischer Influenza-Viren sind, die es dem Virus ermöglichen der menschlichen Immunantwort zu entgehen. Im Gegensatz dazu ist bislang ungeklärt, inwiefern das aviäre PB1-Gensegment zur Entstehung pandemischer Influenza-Viren beiträgt. Ziel dieser Arbeit war es, mittels Remodellierung der Pandemie von 1968 aufzuklären, welche Rolle dem aviären PB1-Gensegment bei der Entstehung pandemischer Influenza-Viren zukommt, sowie mögliche Mechanismen zu identifizieren, durch die das aviäre PB1-Gensegment zur Entstehung pandemischer Influenza-Viren beiträgt. Um diese Fragestellungen zu untersuchen wurde folgendes Arbeitsprogramm entworfen:

1. Da das humane H2N2-Vorläufervirus, welches unmittelbar an der Reassortierung des pandemischen HK68-Virus beteiligt war unbekannt ist, sollte zunächst mittels phylogenetischer Stammbaum- und Sequenzanalysen ein humanes H2N2-Ersatzvorläufervirus identifiziert werden, welches phylogenetisch am nächsten verwandt zu dem pandemischen A/Hong Kong/1/68 (H3N2) Virus ist. Ausgehend von diesem Vorläufervirus sollte die Entstehung der Pandemie von 1968 remodelliert werden. Hierfür sollten mittels reverser Genetik rekombinante humane H2N2-Vorläuferviren, sowie rekombinante pandemische HK68-Viren generiert werden, die sich lediglich im Ursprung ihres PB1-Gensegments unterscheiden.
2. Die rekombinant hergestellten Viren sollten hinsichtlich ihrer replikativen Eigenschaften und ihrer Übertragbarkeit im Meerschweinchen-Modell verglichen werden. Mögliche Unterschiede hinsichtlich der Replikations- und Transmissionseffizienz sollten identifiziert und Rückschlüsse auf die Rolle des aviären PB1 bei der Entstehung der Pandemie von 1968 gezogen werden.

3. Bei dem PB1-Gen des pandemischen HK68-Virus handelt es sich um ein aviäres Gensegment, das auf Grund der Zirkulation des pandemischen HK68-Virus in der menschlichen Bevölkerung bereits human-adaptive Mutationen erworben hat. Da jedoch weder bekannt ist in welcher Wirtsspezies die Reassortierung stattgefunden hat, noch bekannt ist, ob das an der Reassortierung unmittelbar beteiligte aviäre PB1 bereits human-adaptive Mutationen aufgewiesen hat, sollte mittels phylogenetischer Studien das nicht-adaptierte aviäre PB1-Gensegment des aviären Vorläufervirus rekonstruiert werden. Anschließend sollte untersucht werden, inwiefern sich nicht-adaptiertes und human-adaptiertes aviäres PB1 hinsichtlich ihrer Replikationseffizienz gegenüber dem humanen PB1 unterscheiden.
4. Sofern für das aviäre PB1-Gen eine signifikant erhöhte Replikationseffizienz nachgewiesen werden kann, sollten die zugrunde liegenden Mechanismen identifiziert werden. Zusätzlich sollten weitere Mechanismen identifiziert werden, durch die das aviäres PB1 zur Entstehung der Pandemie von 1968 beigetragen haben könnte.

II. Material

II.1 Chemikalien

Agarose Seakem®	Cambrex Bio Science, Rockland
Ampicillin (Natriumsalz)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Avicel	FMC Biopolymer
Bacto-Agar	BD Biosciences, Heidelberg
Borsäure	Riedel-de Haen, Seelze
Bromphenolblau (Natrium Salz)	Roth, Karlsruhe
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Merck, Darmstadt
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ethanol (EtOH)	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid (EtBr)	Roth, Karlsruhe
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Roth, Karlsruhe
Formaldehyd	Merck, Darmstadt
Glyzerin	Roth, Karlsruhe
Hefeextrakt	Merck, Darmstadt
Isopropanol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck, Darmstadt
Kristallviolett	Sigma, Deisenhofen
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Merck, Darmstadt
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumacetat (NaOAc)	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄)	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumhydroxid (NaOH)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Paraformaldehyd (PFA)	Roth, Karlsruhe
Pepton	Merck, Darmstadt
Pferdeserum	Sigma-Aldrich, Steinheim
Polyethylenglykol (PEG 4000)	Sigma-Aldrich, Steinheim

Salzsäure (HCl)	Merck, Darmstadt
Sucrose	Serva, Heidelberg
Trishydroxymethylaminomethan (Tris)	Acros Organics, Geel, Belgien
Triton X-100	Serva, Heidelberg
TRIzol Reagenz	Life Technologies, Darmstadt
True Blue	KPL, USA
Tween 80	Sigma-Aldrich, Steinheim
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Xylencyanol	Sigma-Aldrich, Steinheim

II.2 Verbrauchsmaterial

Combi-Tips Ritips	Ritter, Schwabmünchen
Einmalspritzen	B Braun, Melsungen
Eppendorf-Reaktionsgefäße (1,5/2 ml)	Eppendorf, Hamburg
Kryo-Röhrchen (2 ml)	Corning, Niederlande
Mikro-Schraubröhrchen (0,5/1,5/2 ml)	Sarstedt, Nürnberg
Nunc-Immuno 96-well Mikrotiter-Platten	Thermo Scientific, Langenselbold
Parafilm	Pechiney Plastic, Neenah
PCR-Reaktionsgefäße (0,2 ml)	Biozyme, Hess. Oldendorf
Petrischalen, Ø 10 cm	Greiner, Frickenhausen
Plastikpipetten 2, 5 und 10 ml, Cellstar® bio-one	Greiner, Frickenhausen
Polypropylen-Reaktionsgefäße (15 ml, 50 ml)	Greiner, Frickenhausen
PP-Test Röhrchen (5ml)	Greiner, Frickenhausen
Präzisions-Küvetten aus Quarzglas	Hellma, Müllheim
Ripette	Ritter, Schwabmünchen
Skalpell	PfM AG, Köln
TipOne Pipettenspitzen	Starlab, Ahrensburg
Zellkulturflaschen (25, 75 und 175 cm ²)	Greiner, Frickenhausen
Zellkulturplatten (6, 12, 24 und 96 Vertiefungen)	Greiner, Frickenhausen
Zellschaber Greiner bio-one	Greiner, Frickenhausen
Ultrazentrifugenröhrchen Ultraclear™ für den Rotor SW28	Beckman Coulter, Krefeld

II.3 Kommerziell erhältliche Reaktionsansätze

Dual-Luciferase® Reporter Assay System	Promega, Mannheim
peqGold Plasmid Miniprep Kit I	PeqLab, Erlangen
HiSpeed Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
One-Step RT-PCR Kit	Qiagen, Hilden
QIAamp® viral RNA Mini Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick® Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick® PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene, Basel
RNeasy® Mini Kit	Qiagen, Hilden
TOPO®-TA Cloning® Kit	Invitrogen, Karlsruhe
Z-Competent™ <i>E.coli</i> Transformation Kit	Zymo Research, Orange (USA)

II.4 Laborgeräte

Eppendorf Tischzentrifuge 5424	Eppendorf, Hamburg
Eppendorf Research Pipetten (1-10 µl; 10-100 µl; 100-1.000 µl)	Eppendorf, Hamburg
Feinwaage	Sartorius, Göttingen
GelDoc 2000	Biorad, Richmond (USA)
Heizblock Dri Block DB-2A	Techne, Staffordshire (UK)
Hera Safe Laminarflow	Heraeus Instruments, Hanau
Hera Cell 150 Inkubator	Heraeus Instruments, Hanau
Horizontalschüttler 3018	GFL, Burgwedel
Kippschüttler	Keutz, Reiskirchen
Lichtmikroskop Optech Mod. 1B	Exacta + Optech GmbH, München
Luminometer Centro LB 960	Berthold Technologies, Bad Wildbach
Magnetrührer MR 2000	Heidolph, Schwabach
Mikrowellengerät	Bosch
Multifuge 3S-R	Heraeus, Hanau
NanoDrop 1000	PeqLab, Erlangen
Optima™ L-100K Ultrazentrifuge	Beckman Coulter, Krefeld
Spectrafuge™ Mini-Zentrifuge	Labnet International, Woodbridge (USA)

2720 Thermal Cycler	Applied Biosystems, Darmstadt
Wasserbad 1004	GFL, Burgwedel

Software

Microsoft Office 2010-2013	Microsoft USA
MicroWin 2000	Berthold Technologies, Bad Wildbach
BioEdit v.7.0.5.3	Hall TA, 1999
Clone Manager 9	Scientific & Educational Software, USA
GeneDoc version 2.7.000	NRBSC, USA
Chromas 2.23	Technelysium, Australien
Mega 6	Tamura <i>et al.</i> , 2013
Image Lab version 4.0	Bio-Rad Laboratories, USA

II.5 Puffer und Lösungen

II.5.1 Puffer

Antikörperpuffer	Pferdeserum	10%
	Tween 80	1%
	in PBS _{def}	
DNA Probenpuffer (5x)	Glycerin	3 ml
	Bromphenolblau	0,025 g
	Xylencyanol	0,025 g
	dH ₂ O	<i>ad</i> 10 ml
PBS ⁺⁺	NaCl	8,00 g
	KCl	0,20 g
	Na ₂ HPO ₄	1,15 g
	KH ₂ PO ₄	0,20 g
	MgCl ₂	0,10 g
	CaCl ₂	0,13 g
	dH ₂ O	<i>ad</i> 1 l
PBS _{def} (phosphate buffered saline deficient)	wie PBS ⁺⁺ , jedoch ohne MgCl ₂ und CaCl ₂	

TBE-Puffer (10x), pH8,0	Tris	108 g
	Borsäure	55 g
	0,5M EDTA, pH 8,0	4 ml
	dH ₂ O	<i>ad</i> 1 l
TSS-Puffer (<i>transformation and storage solution</i>)	PEG	10 g
	DMSO	5 ml
	1 M MgCl ₂ , pH 6,5	5 ml
	LB-Medium	85 ml
Waschpuffer	Tween 80	0,05%
	PBS _{def}	<i>ad</i> 1 l

II.5.2 Lösungen

Ampicillin-Stammlösung	Ampicillin	100 mg
	dH ₂ O	<i>ad</i> 1 ml
Avicellösung (2,5%)	Avicel	10 g
	dH ₂ O	400 ml
Erythrozytenlösung (1%)	Hühner-/ humanes Blut	1 ml
	(abgesetzte Erythrozythen)	
	PBS _{def}	100 ml
Kristallviolett	Kristallviolett	1 g
	Formaldehyd	270 ml
	dH ₂ O	730 ml
Sucrose-Lösung (20%)	Sucrose	20 g
	PBS _{def}	80 ml

II.6 Nukleinsäure und Nukleotide

II.6.1 Nukleinsäuren als Größenmarker

GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder, 250 - 10.000 bp	Fermentas, St. Leon-Rot
O'Gene Ruler™ 100 bp DNA Ladder, 100 - 1.000 bp	Fermentas, St. Leon-Rot

II.6.2 Nukleotide

Desoxynukleosidtriphosphate (dNTPs)

Fermentas, St. Leon-Rot

Adenosintriphosphat (ATP)

Fermentas, St. Leon-Rot

II.6.3 DNA-Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide (Primer) sind in 5' → 3'-Richtung angegeben und wurden von der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg) synthetisiert.

Für die Klonierungsprimer, mit Ausnahme des Uni12-Primers, sind die *BsmBI*- bzw. *AarI*-Erkennungssequenzen in **fett** und die segment-spezifischen Sequenzen **unterstrichen** dargestellt.

Klonierungsprimer

5' → 3'

Uni12	AGCAAAAGCAGG
Bm-HA-for	TATTCGTCTCAGGGAGCAAAAGCAGGGG
Bm-HA-rev	(wie Bm-NS-rev)
Bm-NS-for	TATTCGTCTCAGGGAGCAAAAGCAGGGTG
Bm-NS-rev	ATATCGTCTCGTATTAGTAGAAACAAGGGTGTTTT
Bm-M-for	TATTCGTCTCAGGGAGCAAAAGCAGGTAG
Bm-M-rev	ATATCGTCTCGTATTAGTAGAAACAAGGTAGTTTTT
Bm-NA-for	TATTCGTCTCAGGGAGCAAAAGCAGGAGT
Bm-NA-rev	ATATCGTCTCGTATTAGTAGAAACAAGGAGTTTTTT
Bm-NP-for	TATTCGTCTCAGGGAGCAAAAGCAGGGTA
Bm-NP-rev	ATATCGTCTCGTATTAGTAGAAACAAGGGTATTTTT
Bm-PB1-for	TATTCGTCTCAGGGAGCGAAAGCAGGCA
Bm-PB1-rev	ATATCGTCTCGTATTAGTAGAAACAAGGCATT
PB2-AarI-for	TATTCACCTGCCTCAGGGAGCAAAAGCAGGTC
PB2-AarI-rev	ATATCACCTGCCTCGTATTAGTAGAAACAAGGTCGTTT
PA-AarI-for	TATTCACCTGCCTCAGGGAGCAAAAGCAGGTAC
PA-AarI-rev	ATATCACCTGCCTCGTATTAGTAGAAACAAGGTACTT

Mutageneseprimer	5' → 3'
PB1_H2N2-976 for	GGGACAACACCAAATGGAATGAGAATCAAAATC
PB1_H2N2-1008 rev	GATTTTGATTCTCATTCCATTTGGTGTGTGCC
PB1_5'-AGCA-for	GTTGGGGGGGAGCAAAAGCAGGCAAAC
PB1_5'-AGCA-rev	GTTTGCCTGCTTTTGCTCCCCCCCCAAC
PB1-R121K-for	CAAACAAGGGTGGACAAGCTGACCCAAGGTCGTC
PB1-R121K-rev	GACGACCTTGGGTCAGCTTGTCCACCCTTGTTTG
PB1-V212L-for	GAAAGAAGAAGCAGAGACTCAACAAGAGAAGCTATC
PB1-V212L-rev	GATAGCTTCTCTTGTTAAGTCTCTGCTTCTTCTTTC
PB1-K327R-for	GATGATTACATATATCACACGCAATCAACCTGAATGGTTC
PB1-K327R-rev	GAACCATTTCAGGTTGATTGCGTGTGATATATGTAATCATC
PB1-S375N-for	CCAGCAGAAATGCTAGCAAATATTGACCTAAAGTATTTTC
PB1-S375N-rev	GAAATACTTTAGGTCAATATTTGCTAGCATTCTGCTGG
PB1-N375S-for	CCAGCAGAAATGCTAGCAAGCATTGACCTAAAGTATTTTC
PB1-N375S-rev	GAAATACTTTAGGTCAATGCTTGCTAGCATTCTGCTGG

Sequenzierungsprimer	5' → 3'
<u>Universelle Sequenzierungsprimer:</u>	
pHW-50eF	CTCACTATAGGGAGACCC
pHW-100eR	GGACAGGTGTCCGTGTCTG

Sequenzierungsprimer verwendet zur Sequenzierung der Gensegmente von A/California/1/66 (H2N2):

PB1-566-for	GAAGAGTAAGAGACAACATGACC
PB1-1099-rev	GTGTTCCGAGCTTCATGCTC
PB1-976-for	GGGACAACACCAAATGGAATGAGAATCAAAATC
PB1-1008-rev	GATTTTGATTCTCATTCCATTTGGTGTGTGCC
PB1-1395-for	GGGAATACAAGCAGGAGTGG
PB2-480 for	TGCCAAGGAGGCACAAGAT
PB2-655-rev	TTCGGACAAGTTCTCTCTCTAAC
PB2-1019-for	GGTCATCAATCAAGAGAGAGGAA
PA-500_for	TCTGAGAAGACACACATCC

PA-754-rev	ACATTTGAGAAAGCTTG
PA-1024-for	CTGGCAGAACTGCAGGACAT
PA-1135-rev	GGGCCATGTTCTCACC
PA-1402-for	GCCTTGCTTAATGCATCCTG
NP-560-for	GGACAATGGTGATGGAGTTGA
NP-652-rev	GTTGCACATTCTCTCGTAAGCAC
NP-975-for	GAGTCAGCTGGTGTGGATGG
NP-1066-rev	CCCTTGGGGATACTTTGGTCCC
H2-629-for	CCTATGTTTCCGCAAGCAC
H2-1061-rev	CCATCCTCCTTCTATAAAGCC
NA-N2-S370L	GGAAGAACAATCAACAAAGATCTCCGCTCAGGTTAT
NA-N2-W403R-rev	CCAGAGTAACCAGAGCGATTATTGTTGTCAAC
NA2-374R	CTCTCGTCACCCAAATGTC

Sequenzierungsprimer verwendet zur Sequenzierung der Gensegmente von A/Hong Kong/1/68 (H3N2):

PB1-566-for	GAAGAGTAAGAGACAACATGACC
PB1-1099-rev	GTGTTCTGGAGCTTCATGCTC
H3-F668	AGCATCAGGGAGAGTCAG
H3-1098-rev	CCAACCGTCTATCATTCCCTC
H3-F1288	GGAGAATTCAGGACCTCG

II.7 Vektoren und rekombinante Plasmide

pHW2000	Bi-direktionales Expressionsplasmid. Enthält den Promotor für die humane RNA-Polymerase I und den Cytomegalie-Virus (CMV)-Promotor für die RNA-Polymerase II. Dieses Plasmid dient zur Generierung rekombinanter Influenza-Viren nach dem „8-Plasmid-System“ nach Hoffmann (Hoffmann <i>et al.</i> , 2000; Hoffmann <i>et al.</i> , 2001). Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Erich Hoffmann.
---------	---

pPol I-NP-luc	enthält den Promotor der humanen RNA-Polymerase I und kodiert für die Firefly-Luziferase als Reportergen (Zugangsnummer in der Datenbank: AF053462), das von den 3' und 5' nicht-kodierenden Regionen des NP Gensegments des A/WS/1933 (H1N1) Virus flankiert wird (Zugangsnummer in der Datenbank: M30746); freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Thorsten Wolff, Robert Koch Institut, Berlin.
pGL4.73 [hRluc/SV40]	enthält den SV40-Promotor und kodiert für die Renilla-Luziferase als Reportergen; Promega, Mannheim

II.8 Enzyme

DNase I	Thermo Scientific, St. Leon-Rot
Pfu DNA-Polymerase	Thermo Scientific, St. Leon-Rot
Phusion® High Fidelity DNA-Polymerase	NEB, Frankfurt a.M.
RevertAid H Minus M-Mulv Reverse Transkriptase	Thermo Scientific, St. Leon-Rot
RiboLock™ RNase Inhibitor	Thermo Scientific, St. Leon-Rot
Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP)	Fermentas, St. Leon-Rot
T4 DNA-Ligase	Fermentas, St. Leon-Rot

Restriktionsendonukleasen:

<i>AarI</i>	5' ... CACCTGC(N) ₄ ↓ ... 3'	Fermentas, St. Leon-Rot
<i>BsaI</i>	5' ... GTCTC(N) ₁ ↓ ... 3'	NEB, Frankfurt a.M.
<i>BsmAI</i>	5' ... GGTCTC(N) ₁ ↓ ... 3'	NEB, Frankfurt a.M.
<i>DpnI</i>	5' ... Gm6A↓TC ... 3'	Fermentas, St. Leon-Rot
<i>Esp3I (BsmBI)</i>	5' ... CGTCTC(N) ₁ ↓ ... 3'	Thermo Scientific, St. Leon-Rot
<i>HindIII</i>	5' ... A↓AGCTT ... 3'	Fermentas, St. Leon-Rot
<i>NcoI</i>	5' ... C↓CATGG ... 3'	Fermentas, St. Leon-Rot
<i>NheI</i>	5' ... G↓CTAGC ... 3'	Fermentas, St. Leon-Rot

II.9 Antikörper

α -Influenza A NP (Maus)	Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta (USA)
α -Maus IgG (Kaninchen); HRP gekoppelt	DAKO Dänemark

II.10 Kultur prokaryotischer Zellen

Prokaryotische Zellen

<i>Escherichia coli</i> , Stamm XL1-blue	Stratagene, La Jolla (USA)
Genotyp: recA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacIqZ Δ M15 Tn10 (Tetr)]	

Kulturbedien für prokaryotische Zellen

LB-Medium	5 g	Hefeextrakt
	10 g	Pepton
	5 g	NaCl
	ad 1 l	dH ₂ O
LB-Agar	1,5% Bactoagar in LB-Medium; (Die Zugabe von 50 μ g/ml Ampicillin erfolgt nach Autoklavieren Abkühlen der Lösung auf unter 50°C.)	

II.11 Kultur eukaryotischer Zellen

Eukaryotische Zellen

Zelllinie

Calu-3	humane Epithelzelllinie aus dem humanen Bronchialepithel
MDCK	Madin-Darby Canine Kidney; permanente Epithelzelllinie aus der Niere eines weiblichen Cockerspaniels
293T	humane, embryonale Nierenepithelzelllinie

Zellkulturmedien und Zusätze für eukaryotische Zellen

Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)	Gibco BRL, Eggenstein
Modified Eagle's medium (2xMEM)	Gibco BRL, Eggenstein
OptiMEM	Gibco BRL, Eggenstein
Fötales Kälberserum (FCS)	Gibco BRL, Eggenstein
Bovines Serum Albumin (BSA) (30%)	PAA, Linz
L-Glutamin [200mM] (100x)	Gibco BRL, Eggenstein
Lipofectamine™ 2000	Invitrogen, Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin ([5000 U/ml]/[5000 µg/ml])	Gibco BRL, Eggenstein
Poly-L-Lysin (0,01%)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Sodiumbicarbonat Lösung (7,5%)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Trypsin EDTA Lösung (0,05%)	Gibco BRL, Eggenstein
Trypsin TPCK	Worthington, Lakewood (USA)

Wachstumsmedium	1x DMEM	500 ml
	FCS	50 ml
	L-Glutamin [200mM]	5,5 ml
	Penicillin/Streptomycin [5000 U/ml]/[5000 µg/ml]	5,5 ml

Infektionsmedium	1x DMEM	500 ml
	BSA (von 30% Stock)	0,1%
	L-Glutamin [200mM]	5 ml
	Penicillin/Streptomycin [5000 U/ml]/[5000 µg/ml]	5 ml

Überschichtungsmedium	2x MEM	125 ml
	BSA (von 30% Stock)	0,6%
	L-Glutamin [200mM]	2,5 ml

Avicel-Überschichtungsmedium	2,5% Avicel-Lösung 1:1 gemischt mit Überschichtungs-Medium
------------------------------	--

II.12 Virusstämme

A/California/1/66 (H2N2)

Freundlicherweise zu Verfügung gestellt von
Dr. Alexander Klimov, Centers for Disease Control and
Prevention, Atlanta (USA) (Lindstrom *et al.*, 2004)

A/Hong Kong/1/68 (H3N2)

Freundlicherweise zu Verfügung gestellt von
Dr. Earl Brown, University of Ottawa, Canada
(Brown *et al.*, 2001)

III. Methoden

III.1 Molekularbiologische Methoden

III.1.1 Herstellung und Transformation kompetenter *Escherichia coli*-Bakterien

Zur Herstellung kompetenter Bakterien wurden *Escherichia coli* XL1-blue-Bakterien verwendet. Um transformations-kompetente Bakterien zu erzeugen, wurden die Bakterien mit TSS-Puffer vorbehandelt und anschließend einem Hitzeschock unterzogen. Erfolgreich transformierte Bakterien wurden über eine plasmidkodierte Antibiotikaresistenz selektioniert. Für eine Übernachtskultur wurden 5 ml LB-Medium mit 100 µl *E.coli* XL1-blue-Bakterien angeimpft und über Nacht (ü.N.) bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert. Am folgenden Tag wurden für die Herstellung von TSS-kompetenten Bakterien 20 ml LB-Medium mit 200 µl der Übernachtskultur angeimpft und für etwa 3-4 h bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert, bis eine OD_{600nm} von 0,5 erreicht war. Nach einer 30 minütigen Inkubation auf Eis wurden die Bakterien für 10 min bei 3.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in 2 ml gekühltem 1xTSS-Puffer resuspendiert und der Ansatz à 200 µl in Eppendorf-Gefäße aliquotiert. Die nun kompetenten Bakterien wurden bis zur weiteren Verwendung auf Eis aufbewahrt.

Zur Transformation wurden 200 µl der kompetenten Bakterien mit 50-100 ng Plasmid-DNA versetzt und der Ansatz für 30 min auf Eis inkubiert. Die kompetenten Bakterien wurden anschließend einer Hitzeschockbehandlung für 45 sec bei 42°C unterzogen und für weitere 2 min auf Eis inkubiert. Um einzelne Bakterienkolonien zu selektionieren wurde der gesamte Transformationsansatz auf mit Antibiotika versetzten Agarplatten ausgestrichen und ü.N. bei 37°C inkubiert.

Um größere Mengen Plasmid-DNA zu erhalten, wurden die transformierten Bakterien nach dem Hitzeschock in 1 ml LB-Medium aufgenommen und für 1 h bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert. Der gesamte Ansatz wurde anschließend in 200 ml mit Antibiotika versetztes LB-Medium gegeben und über Nacht bei 37°C inkubiert.

III.1.2 Herstellung von Bakterien-Kryostocks

Um *E.coli* XL1-blue-Bakterien, sowie transformierte Bakterien langfristig lagern zu können, wurden Bakterien-Kryostocks angelegt. Hierfür wurden die Bakterienkulturen im Verhältnis 1:1 mit 100%igem Glycerin versetzt und bei -80°C in Kryoröhrchen gelagert. Die Bakterien-Kryostocks dienten im Folgenden als Ausgangsmaterial für weitere Plasmid-Amplifikationen.

III.1.3 Präparation von Plasmid-DNA aus *Escherichia coli*-Bakterien

Die Präparation von Plasmiden erfolgte mit Hilfe von kommerziell erhältlichen Kits, die auf der Methode der alkalischen Lyse von Bakterien basieren. Zur Präparation von Plasmid-DNA aus kleineren Volumina Bakterienkultur wurde das peqGOLD Plasmid Miniprep Kit I (PeqLab) verwendet, während die Isolierung von Plasmid-DNA aus größeren Volumina Bakterienkultur mit Hilfe des HiSpeed Plasmid Maxi Kit (Qiagen) erfolgte. Um Plasmid-DNA aus einzelnen Bakterienkolonien mit Hilfe des Mini-Prep-Kits isolieren zu können, wurden 3 ml Antibiotika-haltiges LB-Medium mit einer Bakterienkolonie angeimpft und ü.N. bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert. Diese Übernachtskultur wurde am folgenden Tag zur Plasmid-Präparation verwendet. Um einen Plasmid-Stock anzulegen, wurden 200 ml Antibiotika-haltiges LB-Medium mit dem gesamten Transformationsansatz bzw. 500 µl einer Übernachtskultur angeimpft und am folgenden Tag für die Präparation mit Hilfe des Maxi-Prep-Kits verwendet. Beide Plasmid-Präparationen wurden entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt.

III.1.4 Spektralphotometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Das Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren liegt bei 260 nm. Um die Konzentration von Nukleinsäuren in Lösung zu bestimmen, wird eine Probe mit Licht durchleuchtet und die Absorption mit Hilfe eines Spektralphotometers bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen. Hierbei entspricht eine OD₂₆₀ von 1,0 bei einer Pfadlänge von 1 cm (Schichtdicke der Küvette) einer Nukleinsäure-Konzentration von 50 µg/ml. Die Reinheit von Nukleinsäure-haltigen Lösungen kann durch zusätzliche Messungen bei den Wellenlängen 280 nm und 230 nm bestimmt werden. Für reine DNA-Lösungen liegt das Verhältnis von OD₂₆₀/OD₂₈₀ bei einem Wert von ~1,8, während reine RNA-Lösungen einen Wert von OD₂₆₀/OD₂₈₀ = ~2 aufweisen. Im Allgemeinen weisen OD₂₆₀/OD₂₈₀-Werte die deutlich unter dem Wert von 1,8 liegen auf Verunreinigungen durch Proteine, Phenole oder andere Kontaminationen hin, die ein

Absorptionsmaximum von 260 nm besitzen. Zusätzlich kann die Reinheit von Nukleinsäurehaltigen Lösungen durch das Verhältnis OD_{260}/OD_{230} bestimmt werden, das für reine Nukleinsäure-Lösungen bei einem Wert von 2,0 - 2,2 liegt. Die Konzentration von Nukleinsäure-haltigen Lösungen, sowie deren Reinheitsgrad wurde in der vorliegenden Arbeit mit Hilfe des Spektralphotometers *NanoDrop 1000* (PeqLab) entsprechend den Herstellerangaben bestimmt.

III.1.5 Fällung von DNA

Um DNA-haltige Lösungen zu konzentrieren wurden Ethanol-Fällungen durchgeführt. Hierfür wurde die DNA-Probe durch Zugabe einer 3 molaren Natriumacetat-Lösung (1/10 Volumeneinheit der DNA-Probe) und anschließendem Mischen mit gekühltem 100%igem Ethanol (3 Volumeneinheiten der DNA-Probe) gefällt. Nach einer 10 minütigen Zentrifugation bei 4°C und 14.000 rpm wurde die pelletierte DNA mit 70%igem Ethanol gewaschen, um diese von Salzen, Alkoholresten und anderen kleinen, wasserlöslichen Substanzen zu befreien. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurde der Überstand verworfen und das DNA-Pellet für 5-10 min an der Luft getrocknet. Dieses wurde abschließend in einem für die nachfolgende Verwendung angemessenen Volumen destillierten Wassers (dH₂O) resuspendiert und die DNA-Konzentration wurde mit Hilfe des Spektralphotometers *NanoDrop 1000* (Qiagen) bestimmt (III.1.4).

III.1.6 Restriktionsverdau von doppelsträngiger DNA

Mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen kann doppelsträngige DNA an definierten Nukleotidsequenzen in DNA-Fragmente distinkter Größe gespalten werden. Abhängig vom Restriktionsmuster der Endonuklease werden hierbei spezifische 3'- und 5'-Enden generiert. In dieser Arbeit wurden die in Abschnitt II.8 aufgeführten Restriktionsendonukleasen entsprechend den vom Hersteller empfohlenen Puffer- und Temperaturbedingungen verwendet. Doppelverdaue mit zwei Restriktionsendonukleasen wurden unter Pufferbedingungen durchgeführt, bei denen die Restriktionsendonukleasen nach Herstellerangaben mind. eine Enzymaktivität von 70 – 100% aufweisen. Bei Inkompatibilität zweier Endonukleasen wurden die Verdaue hintereinander durchgeführt und nach dem ersten Verdau gereinigt (III.1.12). Im Allgemeinen wurden zum Verdau von 1 µg DNA 1-10 Einheiten Restriktionsendonuklease eingesetzt. Die Restriktionsansätze wurden bei der für das Enzym

spezifischen Temperatur für 1-3 h bzw. über Nacht inkubiert und nach erfolgtem Verdau wurden die Restriktionsendonukleasen durch Hitze inaktiviert oder mit Hilfe des QIAquick® PCR Purification Kit (Qiagen) von der DNA separiert.

III.1.7 Dephosphorylierung von DNA

Um eine Religation des Vektors nach einem Restriktionsverdau zu verhindern, wurden die Enden des restringierten Vektors mit Hilfe der *Shrimp Alkaline Phosphatase* (SAP) dephosphoryliert. Hierfür wurden in den Vektor-Restriktionsansatz drei Einheiten SAP gegeben und der Reaktionsansatz für 2 h bei 37°C inkubiert. Die anschließende Hitzeinaktivierung der SAP erfolgte durch Inkubation des Reaktionsansatzes bei 65°C für 20 min.

III.1.8 Ligation

Nach Aufreinigung der DNA-Fragmente wurden die restringierten DNA-Insert-Fragmente mit dem dephosphorylierten Vektor ligiert. Bei dieser Methode wird die Fähigkeit der *T4-DNA-Ligase* genutzt freie 3'OH-Gruppen kovalent mit freien 5'Phosphatgruppen zu verknüpfen.

Für die Ligation wurde das Vektor-Fragment mit dem restringierten DNA-Insert-Fragment im Verhältnis 1:2 bis 1:7 gemischt und der Ligationsansatz über Nacht im PCR-Cycler bei 16°C inkubiert. Pro 10 µl Ligationsansatz wurde eine Einheit *T4-DNA-Ligase* eingesetzt.

III.1.9 Amplifikation von DNA durch die Polymerasekettenreaktion (PCR)

Mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR) ist es möglich ein spezifisches DNA-Fragment aus einem komplexen DNA-Gemisch mit Hilfe von sequenz-spezifischen Oligonukleotid-Primer zu amplifizieren. Im ersten Schritt wird die als Template dienende doppelsträngige DNA durch Erhitzen in DNA-Einzelstränge denaturiert (Denaturierung). Ein anschließendes Abkühlen des Reaktionsansatzes ermöglicht den Oligonukleotid-Primern sich sequenz-spezifisch an die komplementären Sequenzen der zu amplifizierenden DNA-Einzelstränge anzulagern (*Primer Annealing*). Nach diesem als Hybridisierung bezeichneten Prozess flankieren die Primer den zu amplifizierenden DNA-Abschnitt und eine DNA-abhängige DNA-Polymerase kann im darauf folgenden Elongationsschritt diesen Bereich komplementär zur Template-DNA synthetisieren (Elongation). Bei der PCR werden diese Schritte zyklisch durchlaufen, wodurch der zu amplifizierende DNA-Abschnitt exponentiell vervielfältigt wird. Um eine möglichst akkurate

Amplifikation zu ermöglichen, wurden in dieser Arbeit alle PCR-Reaktionen mit der aus dem hyperthermophilen Archaeum *Pyrococcus furiosus* isolierten *Pfu*-Polymerase durchgeführt. Diese DNA-Polymerase verfügt über eine 3'-5'-Exonuklease-Aktivität (*Proof-reading* Aktivität) und weist daher eine sehr geringe Fehlerrate von $2,6 \times 10^{-6}$ Mutationen pro Nukleotid und Zyklus auf.

Reaktionsansatz (50 µl):

dH ₂ O	37 µl
Pfu-Reaktionspuffer (10x)	5 µl
dNTP-Mix [10 mM]	2 µl
Primer <i>forward</i> [20 µM]	2 µl
Primer <i>reverse</i> [20 µM]	2 µl
Template-DNA [100 ng/µl]	1 µl
<i>Pfu</i> DNA-Polymerase [2,5 U/µl]	1 µl

PCR-Parameter:

Initiale Denaturierung	94°C	5 min	
Denaturierung	94°C	30 sec	
Hybridisierung	55 – 64°C	30 sec	30 - 35 Zyklen
Elongation	72°C	2 min/kb	
Terminale Elongation	72°C	10 min	
Kühlung	4°C	∞	

Die Elongationszeit ist abhängig von der Länge des zu amplifizierenden DNA-Abschnitts. Daher wurde für die Amplifikation längerer Gensegmente, wie den Polymerase-Genen PB1, PB2 und PA, die Elongationszeit auf 7 min verlängert. Die optimale Hybridisierungs-Temperatur wurde abhängig von der Schmelztemperatur der Primer, die vom GC-Gehalt determiniert wird, abzüglich 5°C bestimmt. Die Elongationstemperatur wurde entsprechend dem Temperatur-Optimum der Polymerase gewählt, das für die *Pfu*-Polymerase bei 72°C liegt. Die PCR-Reaktionen wurde im PCR-Cycler 2720 *Thermal Cycler* (Applied Biosystems) durchgeführt.

III.1.10 Elektrophoretische Auftrennung von DNA im Agarosegel

Mit Hilfe der Gelelektrophorese können DNA-Fragmente entsprechend ihrer Fragment-Länge im Agarosegel aufgetrennt werden. Hierbei beruht diese Methode auf der negativen Ladung des Phosphatrückgrates der DNA. Durch Anlegen von Spannung bewegt sich die DNA im elektrischen Feld, aufgrund ihrer negativen Ladung von der Kathode (negative Polarität) zur Anode (positive Polarität). Die Geschwindigkeit mit der die DNA-Fragmente das Gel durchlaufen ist dabei negativ proportional zu ihrer Länge. Dementsprechend durchlaufen kürzere Fragmente die Poren des Agarosegels schneller als längere Fragmente und sind in Folge dessen im unteren Teil des Gels lokalisiert. Die Porengröße des Gels hängt von der Agarosekonzentration ab. Im Rahmen dieser Arbeit wurden 0,8%ige Agarosegele verwendet. Als Puffer diente 1xTBE-Puffer. Die Proben wurden mit 5x konzentriertem DNA-Probenpuffer versetzt und als Größenstandard wurden die DNA-Marker GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder und O'Gene Ruler™ 100 bp DNA Ladder verwendet. Die Elektrophorese erfolgte bei einer konstanten Spannung von 120 V und 50 mA. Die aufgetrennten DNA-Banden im Gel wurden mit Hilfe von Ethidiumbromid, das in doppelsträngige DNA interkaliert, angefärbt und durch Anregung mit UV-Licht im Gel visualisiert. Die Analyse der Agarosegele erfolgte in dieser Arbeit mit Hilfe des Gel-Dokumentationssystems *GelDoc 2000* (Bio-Rad).

III.1.11 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Extraktion von elektrophoretisch aufgetrennten DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte mit Hilfe des QIAquick® Gel Extraction Kit (Qiagen). Hierfür wurden DNA-Fragmente der erwarteten Fragment-Länge auf einem UV-Tisch mit einem sterilen Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten und anschließend in einem chaotropen Puffer bei 50°C gelöst. Alle weiteren Aufreinigungsschritte wurden entsprechend dem Herstellerprotokoll durchgeführt. Die DNA wurde abschließend in 50 µl dH₂O eluiert.

III.1.12 Aufreinigung von DNA-Fragmenten und PCR-Produkten

Um DNA-Proben von Primern, Nukleotiden und Enzymen zu reinigen, wurde das QIAquick® PCR Purification Kit (Qiagen) verwendet. Dieses Kit macht sich ähnlich dem zur Gelextraktion verwendeten QIAquick® Gel Extraction Kit (Qiagen) (III.1.11) die Eigenschaft von DNA zu Nutze, unter hohen Salzkonzentrationen und einem pH-Wert über 7,5 an Silikamembranen zu binden. Da Verunreinigungen, wie Salze, Nukleotide, Enzyme, Primer, Farbstoffe oder

Ethidiumbromid diese Bindungseigenschaften nicht besitzen, werden diese durch Waschen der Silikamembran mit einem Ethanol-haltigen Puffer aus der DNA-Probe entfernt. Die Aufreinigungsschritte wurden entsprechend dem Herstellerprotokoll durchgeführt und die DNA wurde abschließend in 40 µl dH₂O eluiert.

III.1.13 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung von DNA wurde in dieser Arbeit von der Firma SeqLab durchgeführt und erfolgte nach der Kettenabbruchmethode nach Sanger. Bei dieser Methode wird eine PCR mit 4 Desoxynukleotiden (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), sowie 4 fluoreszenz-gekoppelten Didesoxynukleotiden (ddATP, ddGTP, ddCTP, ddTTP) durchgeführt. Den fluoreszenzgekoppelten-Didesoxynukleotiden fehlt die 3'-Hydroxylgruppe, welche für die Ausbildung der Phosphodiesterbindung zwischen den dNTP's essentiell ist. Daher kann bei Einbau eines Didesoxynukleotids in das amplifizierte DNA-Fragment, keine Kettenverlängerung mehr stattfinden und es entstehen DNA-Abbruchfragmente unterschiedlicher Länge. Diese können nach Aufreinigung mittels Kapillarelektrophorese entsprechend ihrer Länge aufgetrennt werden. Durch Anregung der an die ddNTP's gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffe, kann über die Abfolge der Lichtsignale die Sequenz ermittelt werden.

Für die Sequenzierung von PCR-Produkten wurden 22,5 ng DNA pro 100 bp mit dem entsprechenden Primer [20 µM] gemischt und der Sequenzierungsansatz mit auf 15 µl aufgefüllt.

III.1.14 Zielgerichtete Mutagenese

Die zielgerichtete Mutagenese ermöglicht *in-vitro* das Einführen von einzelnen bzw. mehreren Nukleotidaustauschen, sowie das Einfügen von Insertionen und Deletionen in das gewünschte Plasmid. Zum Einfügen der Mutation werden zwei gegenläufige, zur Zielsequenz komplementäre Primer verwendet, die beide mittig die gewünschte Mutation tragen und diese zu beiden Seiten mit 15 Nukleotiden flankieren. Die Primer lagern sich im Verlauf der darauf folgenden inversen PCR, jeweils komplementär an gegenüberliegende Stränge des Plasmids an und werden durch die *Pfu* DNA-Polymerase elongiert. Hierdurch entstehen Plasmide, die aufgrund einer fehlenden Ligase im Reaktionsansatz nicht kovalent geschlossen sind. Das mutierte Plasmid ist, im Gegensatz zu dem parentalen Plasmid, aufgrund der

fehlenden *Dam-Methylase* im *in-vitro* System unmethyliert und kann anhand dieses Merkmals von den parental, methylierten Plasmiden unterschieden werden. Ein anschließender *DpnI*-Verdau führt zur Restriktion der methylierten, parental Plasmide und hat somit eine Selektion der mutierten, unmethylierten Plasmide zur Folge. Nach *DpnI*-Verdau liegen überwiegend mutierte Plasmide im Reaktionsansatz vor, die mittels Transformation in kompetente *E.coli* XL1-blue-Bakterien eingebracht werden (III.1.1). In den Bakterien werden die Einzelstrangbrüche ligiert und die Plasmide amplifiziert.

In der vorliegenden Arbeit erfolgte die zielgerichtete Mutagenese mit Hilfe des QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) unter Verwendung der in Abschnitt II.6.3 aufgeführten Mutageneseprimer.

Reaktionsansatz (50 µl):

dH ₂ O	37 µl
Pfu-Reaktionspuffer (10x)	5 µl
dNTP-Mix [10 mM]	2 µl
Primer <i>forward</i> [20 µM]	2 µl
Primer <i>reverse</i> [20 µM]	2 µl
Template-DNA [50 - 100 ng/µl]	1 µl
<i>Pfu</i> DNA-Polymerase [2,5 U/µl]	1 µl

PCR-Parameter:

Initiale Denaturierung	95°C	5 min	
Denaturierung	95°C	30 sec	
Hybridisierung	52 – 56°C	30 sec	16 Zyklen
Elongation	68°C	2 min/kb	
Terminale Elongation	68°C	10 min	
Kühlung	4°C	∞	

Nach der Quik Change™ PCR-Reaktion erfolgte ein Restriktionsverdau der methylierten, parental Plasmid-DNA mit Hilfe der Restriktionsendonuklease *DpnI*, welche die Nukleotidsequenz 5'-Gm6ATC-3' erkennt.

DpnI-Verdau:

PCR-Ansatz	50 µl
Puffer Tango™ (10x)	5 µl
DpnI	10 U

Der *DpnI*-Verdau wurde für eine Stunde bei 37°C inkubiert und das Enzym durch eine 20 minütige Inkubation bei 80°C inaktiviert. Der Mutagenese-Ansatz wurde anschließend in chemisch kompetente *E.coli* XL1-blue-Bakterien transformiert (III.1.1) und auf mit Antibiotika versetzten Agarplatten ausplattiert. Der Erfolg der Mutagenese wurde durch Selektion einzelner Klone und Sequenzierung (III.1.13) mittels Mini-Prep (III.1.3) präparierter Plasmide überprüft.

III.1.15 Reverse Transkription – Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

Mit Hilfe der Reversen Transkription-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) ist eine Amplifikation von cDNA aus einzelsträngiger RNA möglich. Hierbei stellt die RT-PCR eine Kombination von zwei aufeinanderfolgenden molekularbiologischen Methoden dar: der Reversen Transkription (RT) und der Polymerase-Kettenreaktion (PCR). In der Reversen Transkription wird die virale RNA mittels einer reversen Transkriptase in einzelsträngige cDNA umgeschrieben, während in der darauf folgenden PCR die gebildete, einzelsträngige cDNA mittels einer hitzestabilen DNA-Polymerase zu doppelsträngiger cDNA komplementiert wird.

III.1.15.1 Einstufige RT-PCR

Zur Genotypisierung der viralen Genome wurde eine einstufige RT-PCR durchgeführt, die mit Hilfe des OneStep RT-PCR Kits (Qiagen) erfolgte. In diesem Kit ist ein Enzym-Mix enthalten, welcher sowohl die reversen Transkriptasen Omniscript™ und Sensiscript™, als auch die HotStarTaq-Polymerase™ enthält. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben.

Reaktionsansatz (50 µl):

dH ₂ O	24 µl
OneStep RT-Puffer (5x)	10 µl
dNTP-Mix [10 mM]	2 µl
Primer <i>forward</i> [20 µM]	2 µl
Primer <i>reverse</i> [20 µM]	2 µl
RNase-Inhibitor [40 U/µl]	0,3 µl
RNA	8 µl
OneStep RT-PCR Enzyme Mix	2 µl

PCR-Parameter:

Reverse Transkription	45°C	30 min	
Hitzeinaktivierung	95°C	15 min	
Denaturierung	95°C	20 sec	
Hybridisierung	55°C	30 sec	35 Zyklen
Elongation	68°C	7 min	
Terminale Elongation	68°C	10 min	
Kühlung	4°C	∞	

III.1.15.2 Zweistufige RT-PCR

Zur Klonierung der viralen Gensegmente in den reversen Genetik Vektor pHW2000 wurde eine zweistufige RT-PCR durchgeführt. Hierfür wurde zunächst isolierte virale RNA mit Hilfe der *RevertAid H Minus M-Mulv* Reversen Transkriptase unter Verwendung des für Influenza-Viren spezifischen Uni12-Primers in cDNA umgeschrieben. Der Uni12-Primer ist komplementär zu dem zwischen allen acht Gensegmenten hochkonservierten Sequenzbereich des 3'NCR und ermöglicht somit die reverse Transkription aller acht Gensegmente.

RT-Reaktionsansatz (20 µl):

vRNA	4,7 µl
Uni12-Primer [20 µM]	2 µl
dH ₂ O	6 µl

Dieser vorläufige RT-Reaktionsansatz wurde für 5 min bei 65°C im Thermocycler inkubiert, um mögliche Sekundärstrukturen der RNA zu denaturieren. Diesem wurden nach erfolgter Inkubation für die reverse Transkription folgende Komponenten zugesetzt:

RevertAid H Minus M-Mulv RT-Puffer (5x)	4 µl
dNTP-Mix [10 mM]	2 µl
RNase-Inhibitor [40 U/µl]	0,3 µl
<i>RevertAid H Minus M-Mulv</i> RT	1 µl

RT-Parameter:

Reverse Transkription	42°C	60 min
Hitzeinaktivierung	70°C	10 min
Kühlung	4°C	∞

In der anschließenden PCR wurde die gewonnene cDNA mit Hilfe einer DNA-abhängigen DNA-Polymerase unter Verwendung von segment- oder sequenzspezifischer Primer amplifiziert. Im Gegensatz zu der im OneStep RT-PCR Kit enthaltenen HotStarTaq-PolymeraseTM wurde bei dieser PCR die *Pfu* DNA-Polymerase verwendet, welche eine 3'-5'-Exonuklease-Aktivität aufweist und somit eine akkurate Amplifikation der cDNA ermöglicht.

RT-PCR Reaktionsansatz (100 µl):

dH ₂ O	73 µl
Pfu-Reaktionspuffer (10x)	10 µl
dNTP-Mix [10 mM]	2 µl
Primer <i>forward</i> [20 µM]	1,5 µl
Primer <i>reverse</i> [20 µM]	1,5 µl
Template (cDNA RT)	10 µl
<i>Pfu</i> DNA-Polymerase [2,5 U/µl]	2 µl

RT-PCR-Parameter:

Initiale Denaturierung	94°C	5 min	
Denaturierung	94°C	30 sec	
Hybridisierung	52 – 56°C	30 sec	35 Zyklen
Elongation	68°C	2 min/kb	
Terminale Elongation	68°C	10 min	
Kühlung	4°C	∞	

Für die Amplifikation der Polymerase-Gensegmente PB1, PB2 und PA, welche eine Länge von circa 2,4 kb aufweisen, wurde die Elongationszeit auf 10 min verlängert.

Die RT-PCR Reaktionsansätze wurden wie in Abschnitt III.1.12 beschrieben gereinigt.

III.1.16 Bestimmung der Polymerase-Aktivität rekonstituierter vRNP-Komplexe

Mit Hilfe von Luziferase-Minigenom Assays kann die Polymerase-Aktivität einzelner rekonstituierter viraler Ribonukleoproteinkomplexe *in vitro* mittels eines Reportergens gemessen werden. Als Reportergen dient in diesem Assay die *Firefly-Luziferase*, die im pPol I-NP-luc-Plasmid in negativer Orientierung vorliegt und unter der Kontrolle eines Polymerase I-Promotors (Pol I) steht. Diese wird sowohl am 3′-, als auch am 5′-Ende von den Influenza-spezifischen 3′- und 5′NCRs des NP-Gensegments flankiert (Abb. III.1, a).

Nach Transfektion der für die vRNP-Komplex kodierenden Plasmide pHW2000-PB1, -PB2, -PA und -NP, sowie des für die *Firefly-Luziferase* kodierenden Plasmids pPol I-NP-luc in 293T-Zellen, bindet zunächst die zelluläre DNA-abhängige RNA-Polymerase I an den Pol I-Promotor des Luziferaseplasmids und schreibt dieses in virale RNA (vRNA) um (Abb. III.1, b). Die für die Untereinheiten des vRNP-Komplex kodierenden pHW2000-Plasmide stehen sowohl unter der Kontrolle eines Pol I-, als auch eines Pol II-Promotor. Somit können die Polymeraseplasmide sowohl in vRNA, als auch mittels der zellulären DNA-abhängigen RNA-Polymerase II in mRNA transkribiert werden (Abb. III.1, c). Die gebildeten vRNP-mRNA's werden in das Cytoplasma der 293T-Zellen transportiert, wo die Translation der vRNP-Untereinheiten und die Proteinsynthese stattfindet (Abb. III.1, d). Die synthetisierten vRNP-Untereinheiten können mit der gebildeten vRNA des Luziferaseplasmids zu vRNP-Komplexen assemblieren und die Luziferase-vRNA in Luziferase-mRNA transkribieren (Abb. III.1, e).

Diese wird im Cytoplasma translatiert, wodurch es zur Expression der *Firefly-Luziferase* kommt (Abb. III.1, f). Die *Firefly-Luziferase* oxidiert Luziferin zu Oxyluziferin, wodurch Licht einer Wellenlänge von 560 nm emittiert wird, das mit Hilfe eines Luminometers gemessen werden kann. Somit gibt die Aktivität der *Firefly-Luziferase* proportional die Aktivität des viralen Polymerasekomplexes wieder.

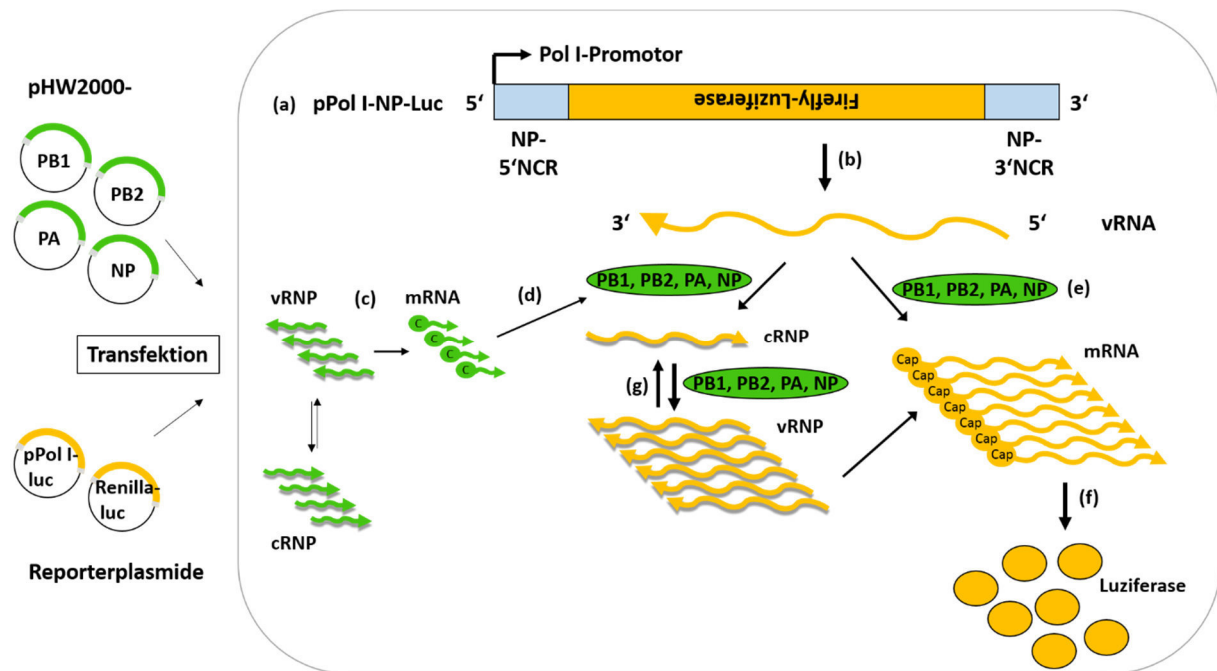


Abb. III.1: Prinzip des Luziferase-Minigenom Assays.

Neben der Transkription der Luziferase-mRNA kommt es zudem zur Replikation der Luziferase-vRNA in Luziferase-cRNA die erneut in Luziferase-vRNA von dem viralen Polymerasekomplex repliziert wird und sowohl der viralen Transkription als auch der viralen Replikation zur Verfügung steht (Abb. III.1, g). Zur Standardisierung der Transfektionseffizienz wird zur Kontrolle ein weiteres Reporterplasmid, das für die *Renilla-Luziferase* kodiert, kotransfiziert. In diesem steht die *Renilla-Luziferase* unter der Kontrolle des konstitutiv exprimierenden SV40-Promotors, der von der zellulären DNA-abhängigen RNA-Polymerase erkannt wird. Im Allgemeinen wurden in dieser Arbeit die Polymerase-Aktivitäten in 3-fach bzw. 5-fach Bestimmung ermittelt, um mögliche Variationen in der Zellzahl oder Transfektionseffizienz zu reduzieren.

III.1.16.1 Transfektion von Säugerzellen und Zellyse

Für die Transfektion (III.2.5) wurden 293T-Zellen verwendet, die am Tag der Transfektion zu 80% konfluent waren. Als Transfektionsagens diente Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen).

Transfektionsansatz:

pHW2000-PB1	[1 µg]
pHW2000-PB2	[1 µg]
pHW2000-PA	[1 µg]
pHW2000-NP	[1 µg]
pPol I-NP-Luc	[1 µg]
pGL4.73	[200 ng]

Mock-Kontrolle:

pHW2000-PB2	[2 µg]
pHW2000-PA	[1 µg]
pHW2000-NP	[1 µg]
pPol I-NP-Luc	[1 µg]
pGL4.73	[200 ng]

6 h nach Transfektion wurde das Transfektionsmedium von den Zellen genommen und gegen ein entsprechendes Volumen Wachstumsmedium ersetzt. Nach einer weiteren Inkubation von 18 bis 20 h bei 37°C erfolgte die Zellyse unter Verwendung des in dem Kit enthaltenen Passive Lysis Buffer (PLB). Hierfür wurden die Zellen zunächst mit PBS_{def} gewaschen und anschließend mit 1x PLB (aus 5x PLB-Konzentrat verdünnt in dH₂O) für 30 min auf dem Schüttler bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Die erhaltenen Zellysate wurden durch Zentrifugation vom Zelldebris befreit und bis zur Bestimmung der Luziferase-Aktivität auf Eis inkubiert.

III.1.16.2 Bestimmung der Luziferase-Aktivität

Die Bestimmung der Luziferase-Aktivitäten erfolgte mit Hilfe des Dual-Luciferase® Reporter Assay System (Promega). Dieses Kit macht sich die Eigenschaften der aus dem Glühwürmchen stammenden *Firefly-Luziferase* und der aus der Seefeder stammenden *Renilla-Luziferase* zu Nutze, die in diesen Organismen eine Biolumineszenz induzieren. In der Molekularbiologie werden diese beiden Luziferasen aufgrund ihrer hohen Sensitivität zunehmend als Reporter in Promotorstudien verwendet. Beide Luziferasen oxidieren ihr Substrat. In Folge dessen kommt es zu einer Lichtemission, die mit Hilfe eines Luminometers gemessen werden kann. Zur Bestimmung der Luziferase-Aktivität wurden 20 µl Zellysat in geeignete Mikrotiterplatten pipettiert und die Luziferaseaktivitäten mit Hilfe des Luminometers Centro LB 960 (Berthold Technologies) gemessen. Dieses Gerät besitzt Injektionsnadeln, mit Hilfe derer zu jeder

Reaktion 50 µl Firefly-Luziferase-Substrat (Luciferase Assay Reagent II, LAR II) injiziert wurden. Durch Zugabe des Renilla-Luziferase-Substrats (Stop & Glo® Reagent) wird die Firefly-Luziferase-Aktivität inhibiert, wodurch die Aktivität der *Renilla-Luziferase* gemessen werden kann. Die Messungen der Firefly- und Renilla-Luziferaseaktivitäten erfolgten bei 560 nm und 480 nm für jeweils 5 sec und zur Auswertung der Messungen wurde die Software MicroWin 2000 (Berthold Technologies) verwendet.

III.1.17 Bestimmung der viralen Polymerase-Genauigkeit

Die Polymerase-Genauigkeit kann basierend auf der Mutations-Frequenz eines spezifischen, nicht unter Selektionsdruck stehenden Gensegments bestimmt werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Mutations-Frequenz rekombinanter HK68-Viren bestimmt, welche sich lediglich im Genotyp des PB1-Gensegments unterscheiden. Hierbei erfolgte die Bestimmung der Mutations-Frequenzen in Kooperation mit Herrn Dr. Marco Vignuzzi und Herrn Dr. Kenneth Stapleford (Institut Pasteur, Paris) sowohl durch Sanger Sequenzierung (IV.8.1), als auch durch sog. „*Deep Sequencing*“ unter Verwendung der Illumina GAII-X-Sequenzierungsplattform (IV.8.2). Hierbei gibt die mittels „*Deep Sequencing*“ bestimmte Mutations-Frequenz die Anzahl der Mutationen wieder, welche bei Sequenzierung mehrerer Klone des gleichen Gensegments zu einem hohen Anteil in der zu untersuchenden Viruspopulation enthalten sind.

Um sicherzustellen, dass die in der Viruspopulation durch Sequenzierung mehrerer Klone identifizierten Mutationen tatsächlich auf die Polymerase-Genauigkeit zurückzuführen sind und nicht von einem Selektionsdruck herrühren, der in dem Austausch des PB1-Gensegments begründet ist, wurde für die Sequenzierung das NS-Gensegment gewählt. Das NS-Protein interagiert im Gegensatz zu den viralen Proteinen des vRNP-Komplexes (PB2, PA und NP) nicht mit dem PB1-Protein in Virionen, wodurch die Wahrscheinlichkeit, dass ein vom Austausch des PB1-Gensegments herrührender Selektionsdruck die Polymerase-Genauigkeit beeinflusst, minimiert wird.

Um des Weiteren die Mutations-Frequenzen der rekombinanten HK68-Viren miteinander vergleichen zu können, war es essentiell, dass die zu untersuchenden Viruspopulationen unter identischen Bedingungen angezogen wurden. Zu diesem Zweck erfolgte die Anzucht der zu untersuchenden Viruspopulationen ausgehend von bestehenden Virusstocks, welche am

selben Tag unter identischen Bedingungen hergestellt wurden und sowohl eine identische Passage-Historie, als auch nahezu identische Virustiter aufwiesen.

Für die Virusanzucht wurden MDCK-Zellen mit einer identischen Infektionsdosis (MOI= 0,001) infiziert (III.3.3.1) und die Zellen im gleichen Brutschrank bei 37°C für 2-3 Tage inkubiert. Anschließend wurden die virushaltigen Zellkultur-Überstände geerntet (III.3.4) und mittels Einzyklischer Replikation titriert (III.3.6.2), um sicherstellen zu können, dass die hinsichtlich ihrer Polymerase-Genauigkeit zu vergleichenden Viruspopulationen annähernd gleiche Virustiter aufwiesen. Nach Titration wurde aus je 700 µl Virussuspension virale RNA mit Hilfe des QIAamp® viral RNA Mini Kit (Qiagen) isoliert (III.3.5.1), die Menge der isolierten viralen RNA wurde mit Hilfe des Spektralphotometers *NanoDrop 1000* (PeqLab) bestimmt (III.1.4) und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C bzw. Trockeneis aufbewahrt.

Die nachfolgende Bestimmung der Mutations-Frequenz einzelner Viruspopulationen mittels Sanger-Sequenzierung bzw. „*Deep Sequencing*“ erfolgte durch Herrn Dr. Marco Vignuzzi und Herrn Dr. Kenneth Stapleford am Institut Pasteur in Paris.

Für die Bestimmung der Mutations-Frequenz mittels Sanger-Sequenzierung wurde die isolierte virale RNA zunächst in einer RT-PCR-Reaktion unter Verwendung NS-spezifischer Primer in DNA umgeschrieben. Um einzelne DNA-Klone der Viruspopulation sequenzieren zu können, wurde das in der RT-PCR Reaktion amplifizierte, etwa 850 bp umfassende DNA-Fragment nach Aufreinigung mit Hilfe des TOPO®-TA Cloning® Kits (Invitrogen) in den Vektor pCR™II-TOPO® kloniert und der Klonierungsansatz in kompetente *E.coli*-Bakterien transformiert. Nach erfolgreicher Klonierung wurde aus mindestens 100 positiven Klonen je Viruspopulation DNA präpariert und für die nachfolgende Sanger-Sequenzierung eingesetzt. Insgesamt wurden je Viruspopulation mindestens 100.000 Nukleotide sequenziert. Die erhaltenen Sequenzen wurden mit Hilfe der Lasergene Software aneinandergelagert und die Anzahl der Mutationen manuell ausgezählt.

Abweichend davon wurde die Mutationsfrequenz der rHK68-Einzelmutanten, sowie der zu vergleichenden Viren rHK68 und rHK-PB1_{HK-121/212/327}, mittels „*Deep Sequencing*“ unter Verwendung der Illumina GAII-X-Sequenzierungsplattform und der ViVan-Pipeline, wie von Isakov *et al.*, 2014 beschrieben, bestimmt.

III.1.18 Sequenzierung der nicht-kodierenden Regionen (NCRs) der viralen Gensegmente mittels 3'RACE und 5'RACE

Die Methode der 3' bzw. 5'RACE-PCR (*Rapid Amplification of cDNA Ends*) ermöglicht eine vollständige Sequenzierung der an den äußersten Enden der viralen Gensegmente lokalisierten NCR-Sequenzen. Hierbei macht sich die 3' bzw. 5'RACE eine Verlängerung der Gensegment-Enden zu Nutze, durch die verhindert wird, dass die bei der Reversen Transkription verwendete Reverse Transkriptase vorzeitig von der vRNA abfällt. Bei der 3'RACE erfolgt die Verlängerung des 3'Endes der vRNA durch Anhängen einzelner CTPs an das 3'OH-Ende durch eine Poly-A-Polymerase, während bei der 5'RACE das 5'Ende der vRNA durch Ligation eines synthetischen RNA-Oligos verlängert wird.

Für die Sequenzierung der 3'NCRs mittels 3'RACE wurde zunächst an das 3'Ende der Gensegmente ein Poly-C-Tail mit Hilfe der Poly-A-Polymerase angehängt. Anschließend wurde die erhaltene RNA mittels eines G/C/I reichen Oligo in cDNA revers transkribiert, die wiederum unter Verwendung G/C/I-reicher, sowie segment-spezifischer Primer in einer PCR-Reaktion amplifiziert wurde. Die Sequenzierung des 3'NCR erfolgte mit Hilfe von segment-spezifischen Primern.

Für die Sequenzierung der 5'NCRs mittels 5'RACE wurde zunächst das 5' Ende der Gensegmente unter Verwendung der Tabbaco-Acid Phosphatase dephosphoryliert. Anschließend wurde mit Hilfe der T4 RNA Ligase ein synthetisches RNA Oligo an das 5' Ende ligiert und das entstandene Produkt mittels Random Hexameren revers transkribiert. Die erhaltene cDNA wurde in einer PCR unter Verwendung segmentspezifischer, sowie für das ligierte Oligo spezifischer Primer amplifiziert. Für die Sequenzierung des 5'NCR wurden segment-spezifische Primer verwendet (Abb. III.2).

Die Sequenzierung der NCR-Sequenzen der A/California/1/66 (H2N2) und A/Hong Kong/1/68 (H3N2) Wildtypisolate erfolgte in Kooperation durch Herrn Prof. Dr. Georg Kochs (Universität Freiburg).

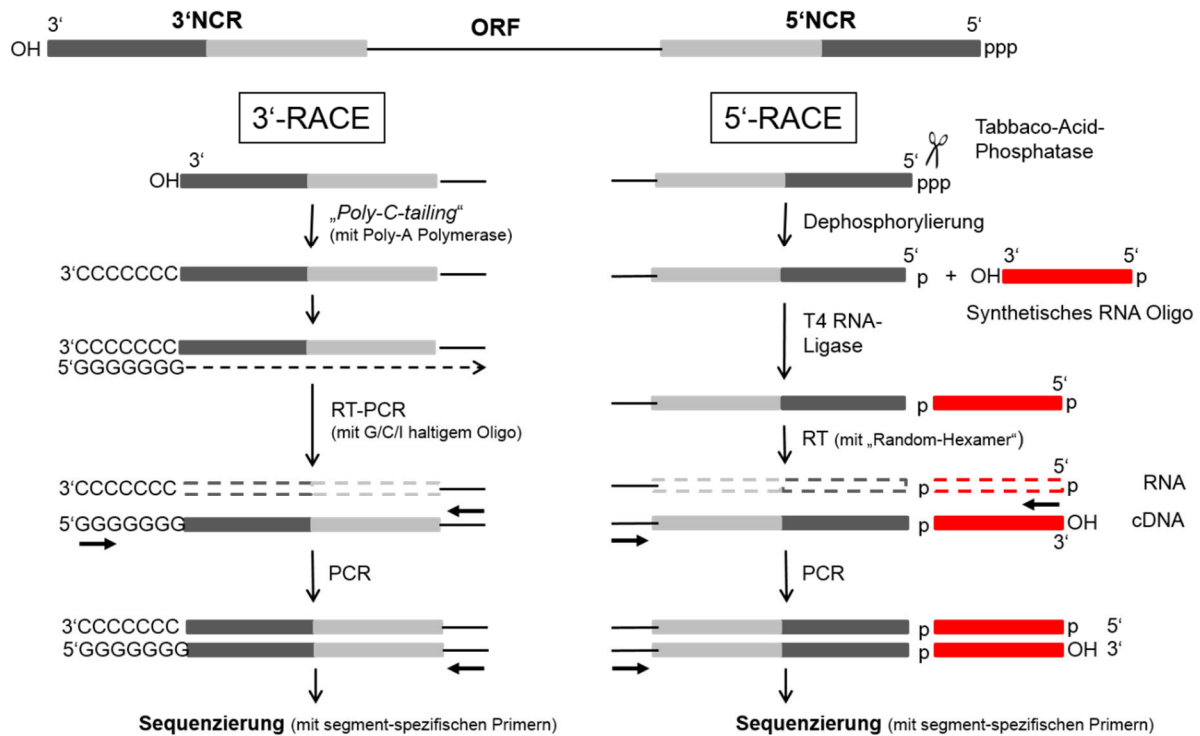


Abb. III.2: Schematische Darstellung der Sequenzierung der 3'NCRs und 5'NCRs mittels 3'-RACE und 5'-RACE.

III.2 Zellbiologische Methoden

III.2.1 Kultivierung eukaryotischer Zelllinien

In der vorliegenden Arbeit wurden folgende Zelllinien verwendet:

- 293T (humane Nierenepithelzellen)
- MDCK (Nierenepithelzelllinie aus einem Cockerspaniel)
- Calu-3 (humane Lungenadenokarzinom-Epithelzellen)

Die Kultivierung dieser permanenten Zelllinien erfolgte in 75 cm² Zellkulturflaschen (Greiner) in DMEM (293T, MDCK) bzw. DMEM-F12 Ham (Calu-3) dem jeweils 10% fötales Kälberserum (FCS), 1% L-Glutamin und 1% Penicillin/Streptomycin zugesetzt wurde. Abhängig vom Wachstumsverhalten der Zellen wurden diese 1-2x pro Woche passagiert. Zusätzlich wurden alle 2-3 Tage die Calu-3-Zellen mit frischem Wachstumsmedium versorgt. Zum Passagieren der konfluent gewachsenen Zellen wurden diese zunächst mit 2 ml Trypsin-EDTA gewaschen und anschließend mit 2 ml Trypsin-EDTA vom Flaschenboden gelöst. Die gelösten Zellen wurden zum Stoppen der Trypsinreaktion in 8 ml FCS-haltigem Wachstumsmedium

resuspendiert. Abhängig vom Wachstumsverhalten wurde ein Teil der Zellen zur weiteren Passage in eine neue Zellkulturflasche überführt. Die Inkubation der adhärent wachsenden Zelllinien erfolgte bei 37°C, 5% CO₂ und 80% Luftfeuchte im Brutschrank.

III.2.2 Einfrieren und Auftauen eukaryotischer Zelllinien

Zur langfristigen Lagerung von Zelllinien wurden Aliquots der Zellen in flüssigem Stickstoff bei -196°C aufbewahrt. Hierfür wurden konfluent gewachsene Zellen vom Flaschenboden abgelöst (III.2.1) und in 8 ml Wachstumsmedium resuspendiert. Nach einer 5 minütigen Zentrifugation bei 1.000 rpm wurde das Zellpellet in 5,4 ml Wachstumsmedium aufgenommen und die Zellsuspension mit DMSO (Endkonzentration 10%) versetzt. Diese wurde anschließend à 0,8 ml in Kryoröhrchen (Corning) aliquotiert, auf -80°C ü.N. im Isopropanoltank gekühlt und am folgenden Tag zur langfristigen Archivierung in flüssigen Stickstoff überführt.

Um in flüssigem Stickstoff gelagerte Zellen wieder in Kultur zu nehmen, wurden diese bei 37°C im Zellkultur-Wasserbad vollständig aufgetaut und in warmem, der Zelllinie entsprechendem Wachstumsmedium resuspendiert. Die Kultivierung der Zellen erfolgte bei 37°C, 5% CO₂ und 80% Luftfeuchte in 25 cm² Zellkulturflaschen (Greiner). Am folgenden Tag wurde das DMSO-haltige Medium gegen frisches Wachstumsmedium ausgetauscht.

III.2.3 Zellzahlbestimmung mit der Neubauer-Zählkammer

Die Bestimmung der Anzahl von Zellen in Zellsuspensionen erfolgte mit Hilfe der Neubauer Zählkammer. Bei dieser handelt es sich um einen Objektträger mit einer um einen definierten Betrag vertieften Mittelfläche, auf der neun quadratische Felder definierter Größe eingätzt sind. Zur Bestimmung der Zellzahl wurde eine zuvor verdünnte Zellsuspension auf die mit einem Deckglas abgedeckte Mittelfläche aufgetragen und die Zellen innerhalb der Quadrate mit Hilfe eines Lichtmikroskops ausgezählt. Die Zellzahl errechnet sich nach folgender Formel:

$$\frac{\text{ausgezählte Zellen}}{\text{ausgezählte Fläche (mm}^2\text{)} \times \text{Kammertiefe (mm)} \times \text{Verdünnung ml Zellsuspension}} = \text{Zellen pro ml Zellsuspension}$$

III.2.4 Beschichten von Zellkulturplatten

Um zu verhindern, dass sich leicht ablösende Zellen, wie 293T-Zellen, während der Transfektion von den Zellkulturplatten lösen, wurden diese vor Kultivierung der Zellen mit Poly-L-Lysin beschichtet. Bei Poly-L-Lysin handelt es sich um ein aus der Aminosäure L-Lysin bestehendes Homopolymer, das die Oberflächenspannung von Kulturträgern ändert und in der Zellkultur verwendet wird um die Zelladhärenz zu verbessern.

Für die Beschichtung der Zellkulturplatten wurde ein entsprechend großes Volumen einer 0,01%igen Poly-L-Lysin Lösung in die Vertiefungen der Platten gegeben und diese für 45 min bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Nach erfolgter Inkubation wurde das Poly-L-Lysin abgenommen und die Platten dreifach mit sterilem PBS_{def} gewaschen. Danach konnten die Zellen wie gewohnt in die Zellkulturplatten ausgesät werden.

III.2.5 Transfektion

Bei der Transfektion werden mit Hilfe eines Transfektionsagens Nukleinsäuren in eukaryotische Zellen eingebracht. Die Gene der in diesem Fall eingebrachten Plasmid-DNA werden von den transfizierten Zellen transient exprimiert. In der vorliegenden Arbeit wurden auf Grund ihrer hohen Transfektionskompetenz 293T-Zellen verwendet. Als Transfektionsagens diente Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen), das eine Mischung kationischer Lipide enthält, welche die einzubringende Plasmid-DNA in Liposomen einschließen. Diese können die Cytoplasmamembran auf Grund ihres Lipidcharakters überwinden und nach erfolgter Transfektion kann die im Cytoplasma vorliegende Plasmid-DNA zur Expression in den Zellkern transportiert werden.

Die Transfektion erfolgte nach Herstellerangaben und die hierfür verwendeten 293T-Zellen wiesen am Tag der Transfektion eine Konfluenz von 70-90% auf. Entsprechend der zu transfizierenden Plasmidmenge und Zellzahl wurde das vom Hersteller empfohlene Volumen Lipofectamine™ 2000 eingesetzt. Die in OptiMEM aufgenommenen Plasmide wurden im Verhältnis 1:1 mit dem in OptiMEM verdünnten Lipofectamine™ 2000 gemischt und für 20 min bei RT inkubiert. Für die Transfektion wurde das Wachstumsmedium der Zellen gegen OptiMEM ersetzt, der Transfektionsansatz zugegeben und die Zellen für 4 - 6 h bei 37°C, 5% CO₂ und 80% Luftfeuchte im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde das Transfektionsmedium gegen Wachstumsmedium ausgetauscht und die Zellen für weitere 24 - 48 h bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

III.3 Virologische Methoden

III.3.1 Generierung rekombinanter Viren mittels Reverser Genetik

Die Herstellung rekombinanter Viren erfolgte in der vorliegenden Arbeit nach dem sogenannten „8-Plasmid-System“ nach Hoffmann (Hoffmann *et al.*, 2000; Hoffmann *et al.*, 2001). Mit Hilfe dieser Methode können infektiöse Influenza-Viren, ausgehend von der in das reverse Genetik Plasmid pHW2000 klonierten viralen cDNA, generiert werden (Abb. III.3).

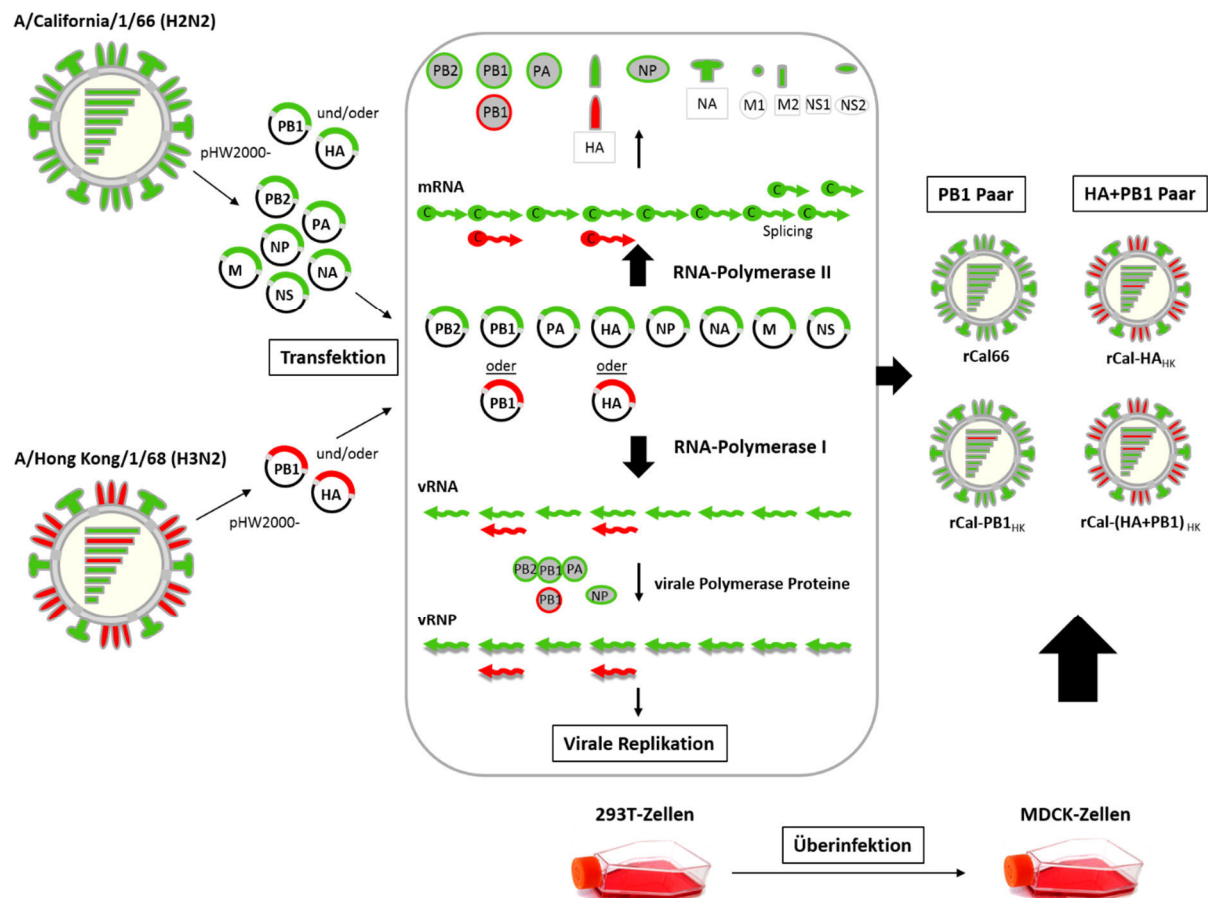


Abb. III.3: Schematische Darstellung des „8-Plasmid Systems“ zur Generierung rekombinanter Influenza-A-Viren nach Hoffmann *et al.*, 2000. Die Plasmide pHW2000-PB2, -PA, -NP, -NA, -M und -NS des Virus A/California/1/66 (grün) wurden zusammen mit den Plasmiden pHW2000-PB1 und -HA, die abhängig von den jeweils zu generierenden Viren entweder von dem Virus A/California/1/66 (grün) oder A/Hong Kong/1/68 (rot) stammen, in 293T-Zellen transfiziert. Innerhalb der Zellen werden die acht unter der Kontrolle von PolII- und PolIII-Promotoren stehenden viralen cDNAs, durch die zellulären RNA-Polymerasen I und II in vRNA und mRNA synthetisiert. Nach Transkription und Translation der viralen Polymerase-Proteine PB2, PB1, PA und NP wird die virale Replikation initiiert, welche durch die Assemblierung aller synthetisierten vRNPs und viralen Proteine in der Generierung der infektiösen Viren des PB1- bzw. des HA+PB1-Paares resultiert. Zur Anzucht der generierten Viren wurden 2 Tage nach Transfektion die virushaltigen 293T-Zellkulturüberstände mit Trypsin-TPCK aktiviert und zur Infektion von MDCK-Zellen verwendet.

In den Plasmiden, welche jeweils für eines der acht viralen Gensegmente kodieren, steht die virale cDNA unter der Kontrolle eines Pol I-, sowie eines Pol II-Promotors. Zur Herstellung der in dieser Arbeit generierten rekombinanten A/California/1/66 (H2N2) Viren (rCal66), wurde zunächst das A/California/1/66 (H2N2) Wildtypisolat (Dr. Alexander Klimov; CDC Atlanta) in MDCK-Zellen (III.3.3.1) und in embryonierten Hühnereiern (III.3.3.2) herangezogen. Ausgehend von der virushaltigen Allantoisflüssigkeit wurde die virale RNA isoliert (III.3.5.1), in einer zweistufigen RT-PCR in cDNA umgeschrieben (III.1.15.2) und mit Hilfe der Restriktionsendonukleasen *BsmBI* (HA, NA, M, NS, PB1, NP) und *AarI* (PB2, PA) in den Vektor pHW2000 kloniert (III.1.8). Die acht generierten pHW2000-Plasmide wurden anschließend in 293T-Zellen transfiziert (III.2.5). Vermittelt durch die Pol I- und Pol II-Promotoren werden in den Zellen messenger RNA's (mRNA), virale Proteine und virale RNA (vRNA) synthetisiert (Abb. III.3). Diese assemblieren in den 293T-Zellen zu viralen Partikeln, die in den Zellkulturüberstand freigesetzt werden. Da nur wenige Viruspartikel von den 293T-Zellen generiert werden, wurde der virushaltige Überstand 48 h nach Transfektion zur Infektion von MDCK-Zellen verwendet.

Um den Erfolg des Virus-Rescue zu überprüfen, wurde anschließend mittels eines Hämagglutinationstest (HA-Test) das Virus direkt nachgewiesen (III.3.6.1). Zur Herstellung eines Virusstocks wurden die im MDCK-Zellkulturüberstand enthaltenen rekombinanten Viren in MDCK-Zellen vermehrt (III.3.3.1). Die Genotypisierung der generierten rekombinant hergestellten Viren erfolgte durch Sequenzierung aller acht Gensegmente (III.3.5).

In Tab. IV.2 sind die Genotypen der in dieser Arbeit hergestellten und verwendeten Cal66-Viren dargestellt. Bei diesen Viren handelt es sich um niedrigpathogene Influenza-Viren, welche eine monobasische Spaltstelle im HA aufweisen. Da 293T- und MDCK-Zellen keine Proteasen exprimieren, welche monobasische Spaltstellen im HA spalten, war in den nachfolgend beschriebenen Infektionsexperimenten die exogene Zugabe von Trypsin erforderlich, um die Infektiosität der Viren zu gewährleisten. Trypsin aktiviert neben dem viralen Hämagglutinin auch die Protease Chymotrypsin durch Spaltung ihres Vorläufers Chymotrypsinogen in zwei enzymatisch aktive Untereinheiten. Um die Aktivität von Chymotrypsin zu inhibieren, wurde in den Infektionsexperimenten Trypsin verwendet, welches mit dem Chymotrypsin-Inhibitor L-(Tosylamido-2-phenyl)-ethyl-chloromethyl-ke-ton (TPCK) behandelt wurde.

Des Weiteren handelt es sich bei den in dieser Arbeit verwendeten Viren um humane Influenza-A-Viren des Subtyps H2N2. Influenza-Viren dieses Subtyps zirkulieren seit 1968 nicht mehr in der menschlichen Bevölkerung und insbesondere die jüngere Bevölkerung, welche nach 1968 geboren wurde, besitzt keine schützende Immunität mehr gegenüber diesen Viren. Daher wurden alle beschriebenen Arbeitsschritte zur Generierung rekombinanter Viren, bei denen potentiell infektiöse Viren entstehen können, sowie alle Infektionsexperimente unter den Bedingungen der Biologischen Sicherheitsstufe 3 (BSL-3) durchgeführt.

III.3.1.1 Virus-Rescue

Für die Transfektion wurden zu 80% konfluent gewachsene 293T-Zellen verwendet. Pro Transfektionsansatz wurde jeweils 1 µg der Plasmide pHW-PB1, pHW-PB2, pHW-PA, pHW-NP, pHW-HA, pHW-NA, pHW-M und pHW-NS in 250 µl OptiMEM pipettiert. Zusätzlich wurde pro Transfektionsansatz ein Transfektionsgemisch bestehend aus 12,5 µl Lipofectamine™ 2000 und 250 µl OptiMEM hergestellt. Nach einer 10 minütigen Inkubation des Transfektionsgemischs bei RT wurde dieses im Verhältnis 1:1 mit den Transfektionsansätzen gemischt und für weitere 20 min bei RT inkubiert. Währenddessen wurde das Wachstumsmedium der 293T-Zellen durch 5 ml OptiMEM ersetzt und nach erfolgter Inkubation wurden die Transfektionsansätze im BSL-3-Labor den Zellen zugegeben. Nach einer 6 stündigen Inkubation der Transfektionen bei 37°C im Brutschrank wurde das Transfektionsmedium gegen 5 ml OptiMEM, das 0,1% BSA enthielt, ersetzt und die Zellen für weitere 48 h bei 37°C inkubiert. Der virushaltige 293T-Zellkulturüberstand wurde für die anschließende Infektion von MDCK-Zellen verwendet. Um die Infektiosität von niedrigpathogenen Influenza-Viren zu gewährleisten, wurde dem 293T-Zellkulturüberstand 1 µg/ml Trypsin TPCK zugegeben und dieser für 1 h bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Der Trypsin TPCK-behandelte Überstand wurde im Folgenden für die Infektion von MDCK-Zellen verwendet. Hierfür wurden die in einer 25 cm² Zellkulturflaschen zu 90% konfluent gewachsenen MDCK-Zellen zunächst 3x mit 3 ml PBS⁺⁺ gewaschen und anschließend mit dem gesamten 293T-Zellkulturüberstand infiziert. Nach einer ein- bis zweistündigen Inkubation der Infektion im Brutschrank wurde der 293T-Zellkulturüberstand von den MDCK-Zellen abgenommen und diese erneut 1x mit 3 ml PBS⁺⁺ gewaschen. Nach Infektion der MDCK-Zellen wurden auf diese für die folgende Inkubation 5 ml Infektionsmedium gegeben, das 1 µg/ml Trypsin TPCK enthielt und 1:100 mit einer 7,5%igen Natriumbicarbonat-Lösung versetzt wurde.

Die Zellen wurden anschließend für bis zu 3 Tage bei 37°C inkubiert bis ein deutlicher zytopathischer Effekt (CPE) zu beobachten war. Der infektiöse Überstand wurde mittels Zentrifugation gereinigt (III.3.4) und das Virus mit Hilfe eines HA-Test (III.3.6.1) nachgewiesen. Die virushaltigen MDCK-Zellkulturüberstände wurden im Folgenden zum Anlegen von Virusstocks auf MDCK-Zellen (III.3.3.1) verwendet.

III.3.2 Plaque-Aufreinigung

Die Viruspopulation eines Virusstocks weist auf Grund der natürlichen Fehlerrate der viralen Polymerase eine gewisse Quasispezies-Diversität auf. Mit Hilfe von Plaque-Aufreinigungen können ausgehend von einem Viruspartikel weitestgehend genetisch identische Viruspopulationen erhalten werden.

Hierfür wurde von der aufzureinigenden Virussuspension eine 1:10 Verdünnungsreihe in Infektionsmedium hergestellt. Die in einer 6-Well-Zellkulturplatte zu einer Konfluenz von 90% gewachsenen MDCK-Zellen wurden für die Infektion 3x mit PBS⁺⁺ gewaschen und anschließend mit 1 ml der hergestellten Virusverdünnungen inokuliert. Nach einer 1-2 stündigen Inkubation bei 37°C im Brutschrank wurden die Zellen erneut mit PBS⁺⁺ gewaschen. Danach wurde das Überschichtungsmedium 1:1 mit einer 1,8%igen erhitzten Bacto-Agar-Lösung gemischt, mit einer entsprechenden Menge Trypsin TPCK versetzt und 3 ml dieser Lösung auf die Zellen gegeben. Zum Erkalten der Agarlösung wurden die Platten für etwa 30 min bei RT belassen, bevor diese für 3 Tage bei 37°C im Brutschrank inkubiert wurden. Nach der dreitägigen Inkubation wurden mit Hilfe einer Pipette einzelne Plaques samt der darüber liegenden Agarschicht ausgestochen und in ein Eppendorf-Gefäß mit 200 µl Infektionsmedium überführt. Um die Diffusion der Viren aus dem Agar zu ermöglichen, wurde das Eppendorf-Gefäß ü.N. bei 4°C inkubiert und am nächsten Tag die homogene Suspension zur Infektion einer zweiten Plaque-Aufreinigung verwendet. Hierfür wurde erneut eine 1:10 Verdünnungsreihe in Infektionsmedium hergestellt, die zur Infektion von MDCK-Zellen verwendet wurde. Nach einer dreitägigen Inkubation im Brutschrank wurden wieder Plaques ausgestochen, in 200 µl Infektionsmedium aufgenommen und ü.N. bei 4°C inkubiert. Diese plaquegereinigte Virussuspension wurde im Folgenden zum Animpfen von MDCK-Zellen (III.3.3.1) oder embryonierten Hühnereiern (III.3.3.2) verwendet.

III.3.3 Virusanzucht

III.3.3.1 Virusanzucht auf MDCK-Zellen

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Varianten der humanen Viren A/California/1/66 (H2N2) und A/Hong Kong/1/68 (H3N2) mit Hilfe des Virus-Rescue (III.3.1) rekombinant hergestellt (Tab. IV.2 und Tab. IV.3). Nach Anlegen von Virusstocklösungen wurden diese für alle nachfolgenden Infektionsversuche verwendet. Um zu verhindern, dass es beim Anlegen der Virusstocklösungen zu adaptiven Mutationen im Ei kommt, erfolgte die Virusanzucht der rekombinant hergestellten Viren nicht nach der klassischen Methode im embryonierten Hühnerei (III.3.3.2), sondern auf Säugetierzellen (MDCK-Zellen).

Hierfür wurden zu 80-90% konfluent gewachsene MDCK-Zellen 3x mit PBS⁺⁺ gewaschen und mit einer MOI (*multiplicity of infection*) von 0,001 (entspricht 20.000 PFU in Infektionsmedium) inokuliert. Die MOI gibt hierbei an wie viele Viruspartikel pro Zelle für die Infektion eingesetzt wurden und berechnet sich nach folgender Formel:

$MOI = \frac{\text{Zellzahl} \times \text{gewünschte MOI}}{\text{Virustiter [PFU/ml]}}$.

Nach Inokulation wurden die Zellen für 1-2 h im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde das Inokulum abgenommen und die Zellen 3x mit PBS⁺⁺ gewaschen. Für die Virusanzucht wurden 25 ml Infektionsmedium mit einer Endkonzentration von 1 µg/ml Trypsin-TPCK auf die Zellen gegeben und diese für bis zu 72 h bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Nachdem sich die Zellen in Folge eines CPE vom Flaschenboden gelöst hatten, wurde der infektiöse Überstand mittels Zentrifugation gereinigt (III.3.4). Die erhaltene Virussuspension wurde à 250 µl bzw. 500 µl in Kryoröhrchen aliquotiert und bei -80°C aufbewahrt. Der Hämagglutinationstiter der Virussuspension, sowie die Anzahl der enthaltenen infektiösen und Plaque-bildenden Partikel pro ml Virussuspension wurden wie in Abschnitt III.3.6 beschrieben, bestimmt.

III.3.3.2 Virusanzucht im embryonierten Hühnerei

Eine klassische Methode zur Anzucht von Influenza-Viren, stellt die Virusanzucht in embryonierten Hühnereiern dar. Bei dieser Methode werden Virusverdünnungen der anzuziehenden Viren in die Allantoishöhle von embryonierten Hühnereier injiziert, in der sich die Viren effizient vermehren können und innerhalb weniger Tage zu hohen Virustitern

heranwachsen. Dementsprechend wird heutzutage diese Methode hauptsächlich zum Anlegen von Virusstocklösungen aviärer Influenza-A-Viren, sowie zur Vermehrung von Impfviren verwendet. In dieser Arbeit wurde das A/California/1/66 (H2N2) Wildtypisolat, aufgrund seiner unbekannten Passage-Historie sowohl in embryonierten Hühnereiern, als auch in MDCK-Zellen herangezogen.

Für die Virusanzucht wurden 11 Tage alte embryonierte Hühnereier verwendet, welche zunächst mit Hilfe einer Lampe durchleuchtet wurden, um die Eier auf das Vorhandensein eines lebendigen Embryos hin zu überprüfen. Die anschließende Injektion der zuvor verdünnten Virussuspensionen (1.000 PFU in 100 µl Infektionsmedium) in die Allantoishöhle erfolgte mit Hilfe einer Kanüle (0,55 x 25 mm), die senkrecht am Embryo vorbei geführt wurde. Die Einstichstelle wurde mit Ponal-Klebstoff (Henkel) versiegelt und die Eier für 48 h bei 37°C und 80% Luftfeuchte im Brutschrank inkubiert. Nach 48 h wurden die Eier ü.N. bei 4°C inkubiert, um eine Kontraktion der Blutgefäße zu bewirken. Zur Entnahme der Allantoisflüssigkeit wurde am folgenden Tag die Eischale im Bereich der Luftblase entfernt und die Allantoisflüssigkeit mit einer Einweg-Plastikpipette entnommen. Durch Zentrifugation bei 3.000 rpm für 15 min und 4°C wurde die Allantoisflüssigkeit von Schwebstoffen und Blut befreit. Der Virustiter der Allantoisflüssigkeit wurde mittels HA-Test und Plaque-Test bestimmt (III.3.6). Zur langfristigen Lagerung wurde die Allantoisflüssigkeit à 500 µl in Kryoröhrchen aliquotiert und bei -80°C aufbewahrt.

III.3.4 Reinigung und Ankonzentrierung von Viren

Um virushaltige Zellkulturüberstände oder Allantoisflüssigkeit von Zellen und Zelldebris zu befreien, wurden diese einer niedrigtourigen Zentrifugation für 30 min bei 3.000 rpm und 4°C unterworfen.

Zur Ankonzentrierung der Viren wurde eine 20%ige Sucrose-Lösung mit der Virussuspension überschichtet und anschließend eine Ultrazentrifugation für 2 h bei 28.000 rpm und 4°C durchgeführt. Der Überstand wurde vorsichtig mit Hilfe einer Pasteur-Pipette abgenommen und das partiell gereinigte Viruspellet wurde in PBS_{def} resuspendiert, aliquotiert und bei -80°C aufbewahrt.

III.3.5 Genotypisierung von Viren

III.3.5.1 Isolierung viraler RNA

Die Isolierung viraler RNA aus Zellkulturüberständen infizierter Zellen, der Allantoisflüssigkeit infizierter embryonierter Hühnereier oder Nasenspülungen infizierter Dunkin-Hartley Meerschweinchen erfolgte mit Hilfe des QIAamp® viral RNA Mini Kit (Qiagen) entsprechend den Herstellerangaben. Bei Verwendung dieses Kits werden die Proben zunächst unter stark denaturierenden Bedingungen lysiert, wodurch kontaminierende RNasen inaktiviert werden. Mit Hilfe von DNasen wird vorhandene DNA zersetzt. Anschließend wird durch Zugabe von Carrier-RNA die Eigenschaft der viralen RNA unter hohen Salzbedingungen und einem pH-Wert über 7,5 an Silicamembranen zu binden, verstärkt. In zwei aufeinander folgenden Waschschritten wird die RNA unter Verwendung von Ethanol-haltigen Puffern gereinigt und abschließend in 50 µl RNase freiem Puffer eluiert.

III.3.5.2 Sequenzierung viraler RNA

Zur Sequenzierung viraler RNA wurde die isolierte RNA in einer Einstufigen RT-PCR in cDNA umgeschrieben (III.1.15.1). Diese wurde anschließend mit Hilfe des QIAquick® PCR Purification Kit (Qiagen) aufgereinigt und zum Ansetzen des Sequenzierungsansatzes wurde die Konzentration der cDNA bestimmt (III.1.12, III.1.13, III.1.4).

III.3.6 Bestimmung des Virustiters

III.3.6.1 Hämagglutinationstest (HA-Test)

Der Hämagglutinationstest beruht auf der Fähigkeit des viralen Oberflächenglykoproteins Hämagglutinin an endständige Sialinsäuren (N-Acetyl-Neuraminsäuren) zu binden, welche sich in großer Anzahl auf der Oberfläche von Erythrozyten befinden. Binden die Hämagglutinine eines Viruspartikels an Sialinsäuren, die sich auf der Oberfläche unterschiedlicher Erythrozyten befinden, kommt es zu einer Quervernetzung der Viruspartikel mit den Erythrozyten (Hämagglutination), wodurch die natürliche Sedimentation der Erythrozyten unterbleibt. Mit Hilfe einer zunehmenden Verdünnung der Virussuspension bei gleich bleibender Erythrozytenkonzentration kann somit eine semi-quantitative Aussage

über die Anzahl der hämagglutinierenden Partikel getroffen werden. Eine Hämagglutinationseinheit (HAU, *hemagglutination unit*) entspricht hierbei dem reziproken Wert der Virusverdünnungsstufe, bei der gerade noch eine Hämagglutination beobachtet werden kann. Auf Grund der Problematik, dass mit Hilfe dieser Methode nicht zwischen infektiösen und nicht-infektiösen Partikeln unterschieden werden kann, diente der HA-Test in der vorliegenden Arbeit lediglich dazu, um die Viruskonzentration grob abzuschätzen.

Zur Durchführung des HA-Tests wurden in die U-förmigen Vertiefungen einer 96-Well Mikrotiterplatte 50 µl PBS_{def} vorgelegt. In die erste Vertiefung wurden 50 µl Virussuspension pipettiert und gut mit dem PBS_{def} vermischt. Ausgehend von dieser 2⁻¹-Verdünnung wurde eine 1:2-Verdünnungsreihe (2⁻¹ - 2⁻¹²) der Virussuspension hergestellt und 50 µl der letzten Verdünnungsstufe verworfen. Anschließend wurden zu jeder Virusverdünnung 50 µl einer 1%igen Hühner- bzw humanen Erythrozytensuspension gegeben. Nach einer 30 bis 60 minütigen Inkubation auf Eis, war in den niedrigeren Virusverdünnungen die Hämagglutination durch eine gleichmäßige Verteilung der Erythrozyten zu erkennen. In den höheren Virusverdünnungen war hingegen keine Hämagglutination mehr möglich, wodurch die Erythrozyten sedimentierten und als distinkte Punkte (sog. „Knöpfchen“) am Boden der Vertiefung sichtbar waren.

Zur Herstellung der verwendeten 1%igen Erythrozytensuspension wurden 1 ml Hühnerblut bzw. humanes Blut mit 50 ml PBS_{def} in einem 50 ml Falcon gewaschen. Nach einer 10 minütigen Zentrifugation bei 2.000 rpm und 4°C wurde der Überstand (Serum) und die Interphase (Leukozyten und Thrombozyten) vorsichtig abgenommen und verworfen. Dieser Waschvorgang wurde etwa 3 bis 4x wiederholt, bis sich oberhalb der Erythrozyten-Phase weder Serum noch Interphase ansammelte. Zur Verwendung für den HA-Test wurde die aufgereinigte 100%ige Erythrozytensuspension auf 1% mit PBS_{def} verdünnt.

III.3.6.2 Bestimmung der infektiösen Viruspartikel (IP) mittels Einzyklischer Replikation

Mit Hilfe der Einzyklischen Replikation kann der Titer infektiöser Partikel (IP) in 0,1 ml Virussuspension bestimmt werden. Hierzu werden MDCK-Zellen mit unterschiedlichen Verdünnungen der Virussuspension infiziert und für 14 – 16 h bei 37°C inkubiert. Auf Grund der kurzen Inkubationszeit und der monobasischen Spaltstelle im HA wird lediglich ein Replikationszyklus durchlaufen, wodurch eine Virusausbreitung durch Nachkommenviren

unterbunden wird. In Folge dessen werden nur einzelne Zellen infiziert, die mit Hilfe einer immunhistochemischen Färbung sichtbar gemacht werden können. Demnach entspricht eine infizierte Zelle einem Viruspartikel. Ausgehend von der Anzahl der infizierten Zellen kann somit unter Einbeziehung der eingesetzten Virusverdünnung, der Titer der infektiösen Partikel in der Virussuspension bestimmt werden. Dieser wird in IP/0,1 ml angegeben.

Zur Titerbestimmung der in einer Virussuspension enthaltenen infektiösen Viruspartikel wurden MDCK-Zellen zu einer Konfluenz von 80 – 90% in 96-Well Zellkulturplatten ausgesät. Diese wurden am folgenden Tag 3x mit PBS⁺⁺ gewaschen. Die zu untersuchende Virussuspension wurde in 1:10-Schritten in Infektionsmedium verdünnt und pro Well wurden 100 µl der Virusverdünnung inokuliert. Nach einer 14-16 stündigen Inkubation bei 37°C im Brutschrank wurden die infizierten Zellen immunhistochemisch angefärbt (III.3.6.4).

III.3.6.3 Bestimmung der Plaque-bildenden Viruspartikel (PFU) mittels Plaque-Test

Die Bestimmung des Virustiters anhand der infektiösen Partikel hat den Nachteil, dass bei dieser Methode nicht überprüft werden kann, ob die Viruspartikel replikationsfähig sind und sich durch infektiöse, replikationsfähige Nachkommenviren ausbreiten können. Daher wurde zusätzlich mit Hilfe des Plaque-Tests die Anzahl der replikationsfähigen Plaque-bildenden Viruspartikel in den Virusstocklösungen bestimmt. Hierfür wurden die Zellen nach Infektion mit Avicel überschichtet, dem exogen Trypsin TPCK zugesetzt wurde, um die Infektiosität der niedrigpathogenen Viren zu gewährleisten. Avicel weist eine gelartige Konsistenz auf und verhindert hierdurch die Ausbreitung der Viren im Kulturmedium. Somit können die von einer infizierten Zelle sezernierten Nachkommenviren lediglich benachbarte Zellen infizieren. Auf Grund der Virusausbreitung auf benachbarte Zellen und der Zytopathogenität der Viren, bilden sich nach einigen Tagen Plaques im Zellrasen aus. Hierbei ist die Anzahl der Plaques proportional zur Anzahl der Plaque-bildenden Viruspartikel. Unter Berücksichtigung der eingesetzten Virusverdünnung kann der Titer der Plaque-bildenden Einheiten (PFU: *Plaque forming units*) in der Virussuspension bestimmt werden. Dieser wird in PFU/ml angegeben.

Für den Plaque-Test wurden MDCK-Zellen zu einer Konfluenz von 80-90% in 6-Well Zellkulturplatten ausgesät. Von der zu untersuchenden Virussuspension wurde eine 1:10-Verdünnungsreihe, bzw. bei bekannten Virustitern eine 1:2-Verdünnungsreihe (III.3.7, III.3.9, III.4.2, III.4.3) in Infektionsmedium hergestellt. Nach dreimaligem Waschen der Zellen mit

PBS⁺⁺ wurden die Zellen mit 1 ml der Virusverdünnungen inokuliert und für 1-2 h bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 1x mit PBS⁺⁺ gewaschen und mit 3 ml/Well Avicel-Überschichtungsmedium, dem Trypsin TPCK in einer Endkonzentration von 1 µg/ml zugesetzt wurde, überschichtet. Nach einer Inkubation der Platten für 3 Tage bei 37°C im Brutschrank wurde das Avicel-Überschichtungsmedium durch mehrmaliges Waschen mit PBS_{def} von den Zellen entfernt. Die infizierten Zellen wurden im Anschluss immunhistochemisch gefärbt (III.3.6.4)

III.3.6.4 Immunhistochemische Färbung infizierter Zellen

Mit Hilfe der immunhistochemischen Färbung können virale Proteine in infizierten Zellen nachgewiesen werden. Hierfür wurden die infizierten Zellen für 30 min bei 4°C mit 100 µl einer 4%igen Paraformaldehyd-Lösung fixiert. Anschließend wurden diese 3x mit PBS_{def} gewaschen und mit 100 µl pro Well einer 0,3%igen Triton-X-100-Lösung für 30 min bei RT permeabilisiert. Zum Detektieren infizierter Zellen wurden 50 µl/Well des monoklonalen Primärantikörpers Maus-anti-NP (1:3000 in Antikörperpuffer verdünnt) auf die Zellen gegeben. Nach einer zweistündigen Inkubation bei RT wurde ungebundener Antikörper durch dreimaliges Waschen mit Waschpuffer entfernt. Zur Detektion gebundener Primärantikörper wurden anschließend 50 µl/Well des Sekundärantikörpers Kaninchen anti-Maus IgG HRP (HRP: *horse radish peroxidase*) (1:2000 in Antikörper-Puffer verdünnt) auf die Zellen gegeben. Nach einer einstündigen Inkubation des Antikörpers bei RT und dreimaligem Waschen mit Waschpuffer, wurden 40 µl/Well True BlueTM Peroxidase Substrat auf die Zellen gegeben. Dieses wird durch die an den Sekundärantikörper gekoppelte Peroxidase zu einem blauen Farbstoff umgesetzt. Nachdem eine deutliche Blaufärbung der infizierten Zellen unter dem Lichtmikroskop zu beobachten war (nach etwa 5-10 min bei RT), wurde das Substrat durch zweimaliges Waschen mit dH₂O von den Zellen entfernt und die Platte zur Aufbewahrung über Kopf an der Luft getrocknet. Zur Bestimmung der infektiösen Partikel in der Virussuspension wurden die blauangefärbten, infizierten Zellen bzw. Virusplaques unter einem Lichtmikroskop der Firma Optech ausgezählt.

III.3.7 Analyse des viralen Wachstumsverhaltens auf Calu-3-Zellen

Mit Hilfe von Wachstumskurven können die replikativen Eigenschaften von Viren untersucht und mit denen anderer Viren verglichen werden. Hierfür werden die Zellen mit einer definierten Anzahl Plaque-bildender Viruspartikel infiziert und über einen bestimmten Zeitraum bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Um das Wachstumsverhalten der Viren verfolgen zu können, wird zu definierten Zeitpunkten der Virustiter im Zellkulturüberstand bestimmt.

Zum Erstellen einer Wachstumskurve wurden Calu-3-Zellen zu einer Konfluenz von 80 – 90% in 6-Well Zellkulturplatten ausgesät. Für die Infektion wurden die Zellen 3x mit PBS⁺⁺ gewaschen und mit einer Infektionsdosis von 10.000 PFU (MOI= 0,01) infiziert. Nach einer ein- bis zweistündigen Inkubation bei 37°C im Brutschrank wurde das Inokulum von den Zellen genommen und durch dreimaliges Waschen mit PBS⁺⁺ ungebundene Viruspartikel entfernt. Für die anschließende Inkubation über einen Zeitraum von 72 h wurden 4,5 ml Infektionsmedium auf die Zellen gegeben. Ab diesem Zeitpunkt wurden zu definierten Zeitpunkten 2x 250 µl Zellkulturüberstand abgenommen und titriert (III.3.6.2).

Eine Zugabe von Trypsin TPCK in das Infektionsmedium ist bei der Infektion von Calu-3-Zellen nicht notwendig, da diese Zellen über eine endogene Protease verfügen, welche die monobasische Spaltstelle im HA niedrigpathogener Viren erkennt und spalten kann.

Um sicherzustellen, dass die Infektion der Zellen mit einer identischen Anzahl Plaque-bildender Viruspartikel erfolgte, wurde von dem Inokulum eine 1:2-Verdünnungsreihe angefertigt und mit Hilfe eines Plaque-Tests (III.3.6.3) der Virustiter der eingesetzten Virusverdünnung bestimmt. Ausgehend von den im Plaque-Test ermittelten Virustitern konnte überprüft werden, ob identische Mengen Plaque-bildender Viruspartikel zur Inokulation der Wachstumskurven eingesetzt wurden. Die Erstellung der Wachstumskurven erfolgte durch Dreifachbestimmung.

III.3.8 Kompetitive Rescue-Experimente

Mit Hilfe von kompetitiven Rescue-Experimenten wurden Viren mit aviärem PB1 im Vergleich zu Viren mit humanem PB1 hinsichtlich ihrer Replikationseffizienz untersucht.

Hierfür wurden 293T-Zellen mit einer 1:1 Mischung der PB1-Plasmide transfiziert, welche für das aviäre PB1-Gen des HK68-Virus oder das humane PB1-Gen des Cal66-Virus kodieren. Zudem wurden sechs Plasmide kotransfiziert, welche für die Gensegmente humanen Ursprungs des rCal66-Virus kodieren, sowie abhängig vom zu untersuchenden Viruspaar

entweder das HA-Plasmid, welches für das humane HA des Cal66-Virus (PB1-Paar) oder das aviäre HA des HK68-Virus (HA+PB1-Paar) kodiert. Zwei Tage nach Transfektion wurden die virushaltigen 293T-Zellkulturüberstände mit Trypsin TPCK aktiviert und für die Infektion von Calu-3 Zellen verwendet. Weitere drei Tage nach Infektion wurde die genotypische Zusammensetzung der kompetitiv hergestellten Virusmischungen durch Sanger-Sequenzierung des PB1-Gensegments bestimmt (IV.3.2).

Um ausschließen zu können, dass bei der Charakterisierung der Virusmischungen transfizierte Plasmid-DNA sequenziert wird, wurde die aus den Virusmischungen isolierte RNA vor der RT-PCR einem DNase I-Verdau unterzogen. Hierfür wurden unter den vom Hersteller empfohlenen Pufferbedingungen 10 µl RNA (~ 1µg RNA) mit einer Einheit *DNase I* behandelt. Die DNase I-Verdaue wurden für 2-3 h bei 37°C im Thermocycler inkubiert. Nach erfolgter Inkubation wurde die *DNase I* durch Zugabe von 1 µl EDTA (25 mM) und einer 10 minütigen Inkubation bei 65°C inaktiviert. Nachdem die DNase I-behandelte RNA mit Hilfe des RNeasy® Mini Kit (Qiagen) entsprechend den Herstellerangaben aufgereinigt wurde, erfolgte die Charakterisierung der Virusmischungen (IV.3.2).

Um sicherzustellen, dass nach DNase I-Verdau keine transfizierte Plasmid-DNA mehr in der Probe vorliegt ist, wurden einige der DNase I-behandelten Proben ohne vorherige reverse Transkription direkt in der PCR-Reaktion eingesetzt.

III.3.9 Koinfektions-Experimente auf Calu-3-Zellen

Mit Hilfe von Koinfektions-Experimenten können zwei zu vergleichende Viren hinsichtlich ihrer Replikationseffizienzen unter kompetitiven Bedingungen untersucht werden. Hierzu werden die zu vergleichenden Viren im Verhältnis 1:1 gemischt und die Virusmischung über mehrere Passagen auf Calu-3-Zellen passagiert. Um zu ermitteln ob eines der beiden Viren einen replikativen Vorteil besitzt, wird nach der letzten Passage die passagierte Virusmischung durch Bestimmung des Anteils der enthaltenen Viren charakterisiert (IV.3.2).

In der vorliegenden Arbeit wurden rCal66-Viren, welche sich lediglich im Ursprung ihres PB1-Gensegments (entweder humanen oder aviären Ursprungs) unterscheiden, mit Hilfe von Koinfektions-Experimenten bezüglich ihrer Replikationseffizienz untersucht. Hierfür wurden Calu-3-Zellen zu einer Konfluenz von 80 - 90% in 12-Well Zellkulturplatten ausgesät. Die zu vergleichenden Viren wurden zu einem Titer von 500 PFU/0,25 ml in Infektionsmedium verdünnt und anschließend im Verhältnis 1:1 gemischt. Die erhaltene Virusmischung (1.000

PFU/0,5 ml) wurde zur Inokulation der Calu-3-Zellen verwendet. Hierfür wurden die Calu-3-Zellen 3x mit PBS⁺⁺ gewaschen und mit 500 µl der Virusmischung (1.000 PFU) infiziert. Nach einer einstündigen Inkubation bei 37°C im Brutschrank, wurde das Inokulum abgenommen, 1 ml Infektionsmedium auf die Zellen gegeben und diese für drei Tage bei 37°C im Zellkulturinkubator inkubiert. Nach 3 Tagen wurden die Zellkulturüberstände gereinigt (III.3.4), aliquotiert und mittels Einzyklischer Replikation (III.3.6.2) titriert. Nach Titration der Passage 1-Zellkulturüberstände wurden diese erneut auf einen Titer von 1.000 IP/0,5 ml in Infektionsmedium verdünnt und zur Infektion der nächsten Passage verwendet. Insgesamt wurden die Virusmischungen über drei Passagen nach dem beschriebenen Prozedere passagiert. Nach der dritten Passage wurden die passagierten Virusmischungen gereinigt (III.3.4) und charakterisiert (IV.3.2).

Mit Hilfe zweier Kontrollen wurde sichergestellt, dass die in den Experimenten eingesetzten initialen Virusmischungen tatsächlich beide Viren im Verhältnis 1:1 enthielten. Zum einen wurde die zur Infektion von Passage 1 verwendete initiale Virusmischung mittels Sanger-Sequenzierung charakterisiert (IV.3.2). Und zum anderen wurden von den Virusverdünnungen, welche zur Herstellung der initialen Virusmischung eingesetzt wurden, 1:2-Verdünnungsreihen in Infektionsmedium hergestellt, deren Virustiter mittels Plaque-Test überprüft wurde (III.3.7). Die Koinfektions-Experimente wurden je Viruspaar und Virusstock in achtfach Bestimmung durchgeführt.

III.4 Tierversuche

Um die Übertragbarkeit von Influenza-A-Viren zu untersuchen und somit das pandemische Potential von Influenza-Viren besser einschätzen zu können, werden in der Influenza-Forschung Kontakt-, sowie Luftübertragungs-Studien durchgeführt. Als gängige, gut etablierte Tiermodelle dienen hier Meerschweinchen und Frettchen, die beide natürliche Wirte der Influenza-Viren darstellen, Influenza-Viren effizient übertragen und bei Infektion dem Menschen ähnliche Krankheitssymptome aufweisen.

In der vorliegenden Arbeit diente das Meerschweinchen als Tiermodell für die Kontaktübertragungs-Studien. Dieses kann ähnlich den Frettchen sehr effizient mit humanen Influenza-Viren infiziert werden, ist wesentlich einfacher in der Handhabung und wird auf

Grund der Tatsache, dass die virale Replikation hauptsächlich im oberen Respirationstrakt stattfindet und somit humane Influenza-Viren effizient zwischen den Tieren übertragen werden, ebenfalls für Kontakt- sowie Luftübertragungs-Studien verwendet (Lowen *et al.*, 2006).

Die in dieser Arbeit beschriebenen Kontaktübertragungs-Studien in Meerschweinchen wurden in Kooperation mit Herrn Prof. Dr. Peter Stäheli und Herrn Dr. Dennis Rubbenstroth entsprechend den lokalen Tierversuchsrichtlinien unter BSL-3 Bedingungen in der Tierversuchsanlage des Instituts für Virologie der Universität Freiburg durchgeführt.

III.4.1 Narkose und Infektion von Dunkin-Hartley-Meerschweinchen

Für die Kontaktübertragungs-Studien wurden 5 – 6 Wochen alte weibliche Dunkin-Hartley-Meerschweinchen mit einem Körpergewicht von 250 – 350 g von den Charles River Laboratories International Inc. bezogen. Zur Infektion wurden die Viren des HA+PB1-Paares mit OptiMEM auf einen Titer von 10^4 PFU in 200 µl Endvolumen verdünnt. Die Meerschweinchen wurden zunächst durch intramuskuläre Injektion einer Ketamine/Xylazine-Mischung (30 mg/kg Ketamine, 2 mg/kg Xylazine) narkotisiert und anschließend wurden die vorbereiteten Virusverdünnungen mit Hilfe einer Pipette in die Nasenöffnungen (je Nasenöffnung 100 µl) der Meerschweinchen geträufelt.

III.4.2 Bestimmung des viralen Wachstumsverhaltens und der Kontaktübertragungs-Effizienz in Meerschweinchen

Um zu überprüfen, ob die rCal-Viren des HA+PB1-Paares effizient in Meerschweinchen replizieren und von den inokulierten Tieren auf die naiven Kontakttiere übertragen werden, wurde zunächst das virale Wachstumsverhalten und die Kontaktübertragungs-Effizienz der beiden zu untersuchenden Viren separat voneinander getestet.

Hierfür wurden pro Virus (entweder rCal-HA_{HK} oder rCal-(HA+PB1)_{HK}) jeweils vier Meerschweinchen intranasal mit einer Infektionsdosis von 10^4 PFU/0,2ml inokuliert (III.4.1). Ein Tag nach Inokulation (*post inoculation*, p.i.) wurden vier naive Kontakt-Meerschweinchen zu den inokulierten Meerschweinchen in den Isolator gesetzt. An den Tagen 2, 4, 6 und 8 p.i. wurde den inokulierten und den naiven Kontakttieren, sowie den naiven Kontakt-Meerschweinchen zusätzlich an Tag 11 p.i. die Nase gespült (III.4.4). Die hierbei erhaltenen

Nasenspülungen wurden nach Marburg versandt und von mir titriert sowie charakterisiert (III.4.6).

Um sicherzustellen, dass die Inokulation der Meerschweinchen mit einer identischen Anzahl Plaque-bildender Viruspartikel erfolgte, wurde von dem Inokulum eine 1:2-Verdünnungsreihe angefertigt und mit Hilfe eines Plaque-Tests (III.3.6.3) der Virustiter bestimmt. Ausgehend von den im Plaque-Test ermittelten Virustitern konnte überprüft werden, ob identische Mengen Plaque-bildender Viruspartikel zur Inokulation der Meerschweinchen eingesetzt wurden.

III.4.3 Kompetitive Kontaktübertragungs-Studien in Meerschweinchen

Im Rahmen kompetitiver Kontaktübertragungs-Studien lässt sich die Replikations- und Übertragungs-Effizienz zweier zu vergleichender Viren im Meerschweinchen unter kompetitiven Bedingungen untersuchen.

Hierfür wurden vier Meerschweinchen intranasal mit einer Infektionsdosis von 10^4 PFU/0,2 ml einer 1:1 Mischung der Viren rCal-HA_{HK} und rCal-(HA+PB1)_{HK} inokuliert. Anschließend wurde wie in Abschnitt III.4.2 beschrieben verfahren. Das an den Tagen 2, 4, 6, 8 und 11 p.i. bei den Nasenspülungen gewonnene Material wurde titriert und charakterisiert (III.4.6).

Um sicherzustellen, dass gleiche Mengen der Viren rCal-HA_{HK} und rCal-(HA+PB1)_{HK} in der zur Inokulation verwendeten 1:1 Mischung vorhanden waren, wurden die Virustiter der Virusverdünnungen die zur Herstellung der 1:1 Mischung eingesetzt wurden, mit Hilfe eines Plaque-Tests (III.3.6.3) bestimmt. Zusätzlich wurde mittels Charakterisierung der eingesetzten 1:1-Virusmischungen sichergestellt, dass diese ein mittleres Verhältnis der Peak-Höhe für PB1_{HK} von ungefähr 0,5 aufweisen, welches reinen Virusmischungen entspricht.

III.4.4 Durchführung von Nasenspülungen bei Meerschweinchen

Zur Durchführung der Nasenspülungen wurden die Meerschweinchen durch intramuskuläre Injektion einer Ketamine/Xylazine-Mischung (30 mg/kg Ketamine, 2 mg/kg Xylazine) narkotisiert. Anschließend wurden jeweils 500 µl PBS in die Nasenöffnungen geträufelt und auf eine sterile Petrischale ablaufen gelassen. Die Proben für 5 min bei 2.000 rpm und 4°C zentrifugiert, à 200 µl aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C aufbewahrt.

III.4.5 Euthanasie der Meerschweinchen

Nachdem die letzten Nasenspülungen der inokulierten Tiere an Tag 8 p.i. und die der Kontakttiere an Tag 11 p.i. erfolgten, wurden die Versuchstiere unter Verwendung des Inhalationsanästhetikums Isofluran euthanasiert.

III.4.6 Titration und Genotypisierung der Nasenspülungen

Um die Infektions- und Replikationseffizienzen der jeweiligen Viren (III.4.2) bzw. Virusmischungen (III.4.3), sowohl in den inokulierten, sowie nach effizienter Übertragung in den naiven Kontakttieren überprüfen zu können, wurden die an den verschiedenen Tagen erhaltenen Nasenspülungen mittels Einzyklischer Titration titriert (III.3.6.2).

Die in den kompetitiven Kontaktübertragungs-Studien (III.4.3) gewonnenen Nasenspülungen wurden 2 Tage p.i. (inokulierte Tiere) bzw. 6 Tage p.i. (Kontakttiere) charakterisiert. Die Charakterisierung der Nasenspülungen wurde, abgesehen von den nachfolgend beschriebenen Abweichungen, wie in Abschnitt IV.3.2 beschrieben durchgeführt.

Die Isolierung der viralen RNA erfolgte, auf Grund des begrenzt verfügbaren Volumens der Nasenspülungen, mit 50 µl Nasenspülung die in 90 µl PBS_{def} verdünnt wurde. Die anschließende Isolation der viralen RNA wurde mit Hilfe des QIAamp® viral RNA Mini Kit entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt und die virale RNA zweifach in 30 µl AVE-Puffer eluiert. Für die reverse Transkription der viralen RNA mit Hilfe des One-Step RT-PCR Kit wurden 25 µl RNA eingesetzt.

III.5 Statistik

Die statistische Auswertung der Polymerase-Aktivität (IV.7) und der Polymerase-Genauigkeit (IV.8) erfolgte mit Hilfe des Student's-t-test. Eine statistische Signifikanz lag vor, wenn der p-Wert < 0,05 war. Die statistische Signifikanz wurde nach folgender Klassifizierung gekennzeichnet: * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001.

Alle übrigen statistischen Auswertungen erfolgten in Kooperation durch Herrn Dr. Jochen Wilhelm (Universität Gießen).

Zur Datenanalyse wurde die frei verfügbare Statistiksoftware *R 3.1.1* (R Core Team, 2014) verwendet. Die Schätzung der Mittelwerte und mittleren Differenzen der Peak-Verhältnisse

für PB1_{HK} $Q = h_{HK} / (h_{HK} + h_{Cal})$ erfolgte durch eine Bootstrap-Analyse mit 10.000 Wiederholungen. Die p-Werte für die zweiseitige Alternativhypothese wurden ebenfalls mittels Bootstrap-Analyse bestimmt (Efron, 1979). Diese Methode wurde verwendet, weil die Verteilung der Peak-Verhältnisse nicht symmetrisch ist. Auf Grund der Variabilität zwischen den einzelnen Versuchen kann sich durch An- und Abreicherung eine bi- oder trimodale Verteilung mit komplexen Zwischenzuständen ergeben. Auf der Annahme normalverteilter Daten berechnete Konfidenzintervalle und p-Werte sind daher nicht korrekt. Die hier bestimmten Mittelwerte sind Schätzer der Erwartungswerte, diese dürfen aber nicht als „typische (häufige) Werte“ interpretiert werden.

Im Text angegebene Zahlen bezeichnen Mittelwerte (oder mittlere Differenzen) mit entsprechenden 95% Konfidenzintervallen in Klammern.

Die Abbildungen zeigen die Daten zusammen mit den Mittelwerten und den 95%-Konfidenzintervallen. p-Werte über einzelnen Gruppen beziehen sich auf die Nullhypothese, gemäß der Erwartung dass das Peak-Verhältnis genau 0,5 beträgt. Die Nullhypothese ist in den Abbildungen als horizontale, gestrichelte Linie dargestellt. p-Werte zwischen einzelnen Gruppen beziehen sich auf die Nullhypothese, gemäß der Erwartung dass beide Gruppen sich nicht voneinander unterscheiden. Die in Abb. IV.7 gezeigte mittlere Differenz zwischen den Viruspaaren PB1 und HA+PB1 wurde für die mittleren Verhältnisse der zur Inokulation verwendeten initialen Virusmischungen adjustiert. Die Berechnung erfolgte durch die Bestimmung der Interaktion im zweifaktoriellen Modell der Faktoren „Replikation“ (vorher/nachher) und „Viruspaar“ (PB1/HA+PB1). Die Interaktion und ihr Konfidenzintervall wurden in gleicher Weise wie alle anderen Mittelwerte durch *Bootstrapping* bestimmt.

III.6 Phylogenetische Stammbaumanalyse

Um die zum pandemischen HK68-Virus nächstverwandten humanen H2N2 (IV.1) und aviären Vorläuferviren (IV.6.1) zu bestimmen, wurden phylogenetische Stammbaumanalysen durchgeführt. Hierfür wurden die für die Stammbaumanalyse benötigten Nukleotidsequenzen der Datenbank *National Center for Biotechnology Information Influenza Virus Ressource* entnommen. Die erhaltenen Sequenzen wurden mit Hilfe des Programms Bioedit (Hall, 1999)

zusammengestellt und den jeweiligen Erfordernissen entsprechend bearbeitet (IV.1; IV.6.1). Die Berechnung der phylogenetischen Stammbäume erfolgte mit Hilfe der Mega6-Software (Tamura *et al.*, 2013) unter Verwendung der Minimal Evolution Methode. Zur Berechnung der statistischen Signifikanz wurde eine Bootstrap-Analyse mit 100 Wiederholungen durchgeführt.

IV. Ergebnisse

IV.1 Phylogenetische Identifikation des humanen A/California/1/66 (H2N2) Virus als humanes Ersatz-Vorläufervirus des pandemischen A/Hong Kong/1/68 (H3N2) Virus

Die Rolle des aviären PB1-Gens bei der Entstehung pandemischer Influenza-Viren, sowie die zugrunde liegenden Mechanismen durch die das aviäre PB1-Gen pandemischen Influenza-Viren einen selektiven Vorteil unterbreitet haben könnte, sollten anhand der Pandemie von 1968 untersucht werden. Die Pandemie von 1968 wurde durch ein Influenza-A-Virus des Subtyps H3N2 verursacht, welches durch Reassortierung entstanden ist. Hierbei reassortierte ein aviäres H3-Virus mit einem unbekannten humanen H2N2 Virus, in dessen Folge das pandemische A/Hong Kong/1/68 (H3N2) Virus (HK68) entstand. Dieses trägt die HA- und PB1-Gensegmente des aviären H3-Virus, sowie die restlichen sechs Gensegmente des humanen H2N2 Vorläufervirus (Abb. IV.1).

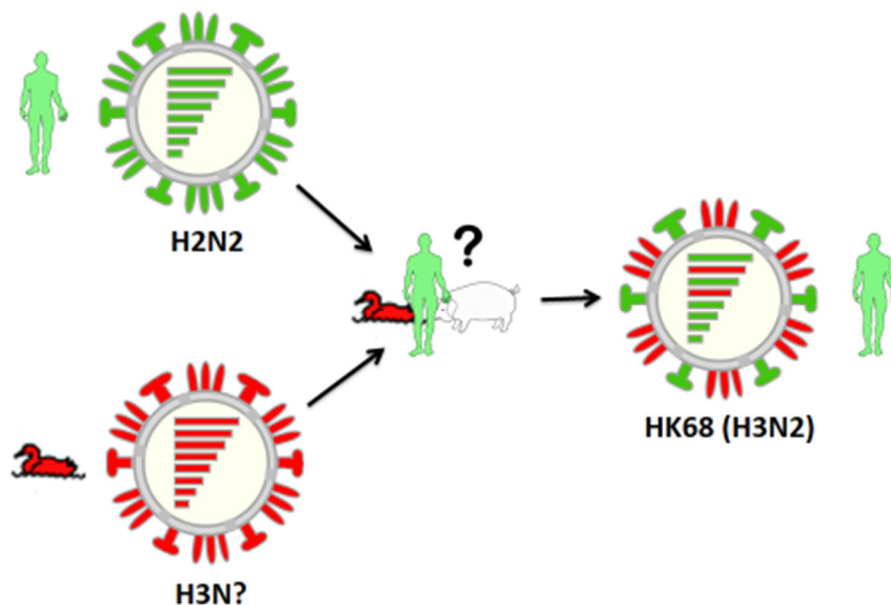


Abb. IV.1: Schematische Darstellung der Entstehung der Pandemie von 1968. Dargestellt ist die Reassortierung zwischen dem humanen H2N2 Vorläufervirus (grün) und dem aviären H3-Virus (rot), welche in der Entstehung des pandemischen HK68-Virus resultierte.

Um zu untersuchen, ob das aviäre PB1-Gen dem pandemischen HK68-Virus einen selektiven Vorteil unterbreitete, indem es die virale Replikations- sowie Übertragungseffizienz erhöhte, sollte die Entstehung der Pandemie von 1968 ausgehend von dem humanen H2N2 Vorläufervirus remodelliert werden. Da die Viren, welche unmittelbar an der Reassortierung des pandemischen HK68-Virus beteiligt waren unbekannt sind, wurden zur Remodellierung der Pandemie diejenigen Viren verwendet, welche phylogenetisch am nächsten verwandt zu den an der Reassortierung beteiligten Vorläuferviren sind. Für das humane H2N2 Vorläufervirus wurde durch Lindstrom *et al.* beschrieben, dass dieses am nächsten verwandt zu einer Gruppe humaner H2N2 Viren ist, welche in den Jahren 1966 und 1967 in der menschlichen Bevölkerung zirkulierten (Lindstrom *et al.*, 2004). Um ausgehend von dieser Information dasjenige humane H2N2 Virus zu bestimmen, welches am nächsten verwandt zu dem unbekannten humanen H2N2 Vorläufervirus ist, wurden Sequenzanalysen durchgeführt. Hierfür wurden die Sequenzen der Gensegmente humanen Ursprungs (PB2, PA, NP, NA, M und NS) des pandemischen HK68-Virus mit denen humaner H2N2 Virusisolate aus den Jahren 1965 bis 1968 phylogenetisch verglichen.

Zum Erstellen des Stammbaums wurden für die humanen H2N2 Virusisolate aus den Jahren 1965 bis 1968, sowie für die pandemischen HK68-Viren des Jahres 1968 die Nukleotidsequenzen der Vollelänge-Genome der Datenbank *National Center for Biotechnology Information Influenza Virus Ressource* entnommen. Da die HA- und PB1-Gensegmente des pandemischen HK68-Virus von dem aviären H3-Virus stammen und somit zur Bestimmung des humanen H2N2 Ersatzvorläufervirus nicht dienen können, wurden diese von der phylogenetischen Stammbaumanalyse ausgeschlossen. Die Nichtkodierenden-Sequenzbereiche der Nukleotidsequenzen der restlichen sechs Gensegmente humanen Ursprungs wurden mit Hilfe des Programms Bioedit (Hall, 1999) deletiert. Die hierbei erhaltenen kodierenden Sequenzbereiche wurden anschließend mit Hilfe des Text Editors manuell in der Reihenfolge PB2-PA-NP-NA-M-NS aneinander gereiht und die konkatenierten Sequenzen zur Berechnung des phylogenetischen Stammbaums verwendet. Die Erstellung des Stammbaums erfolgte mit Hilfe der Mega6-Software (Tamura *et al.*, 2013) unter Verwendung der Minimal Evolution Methode.

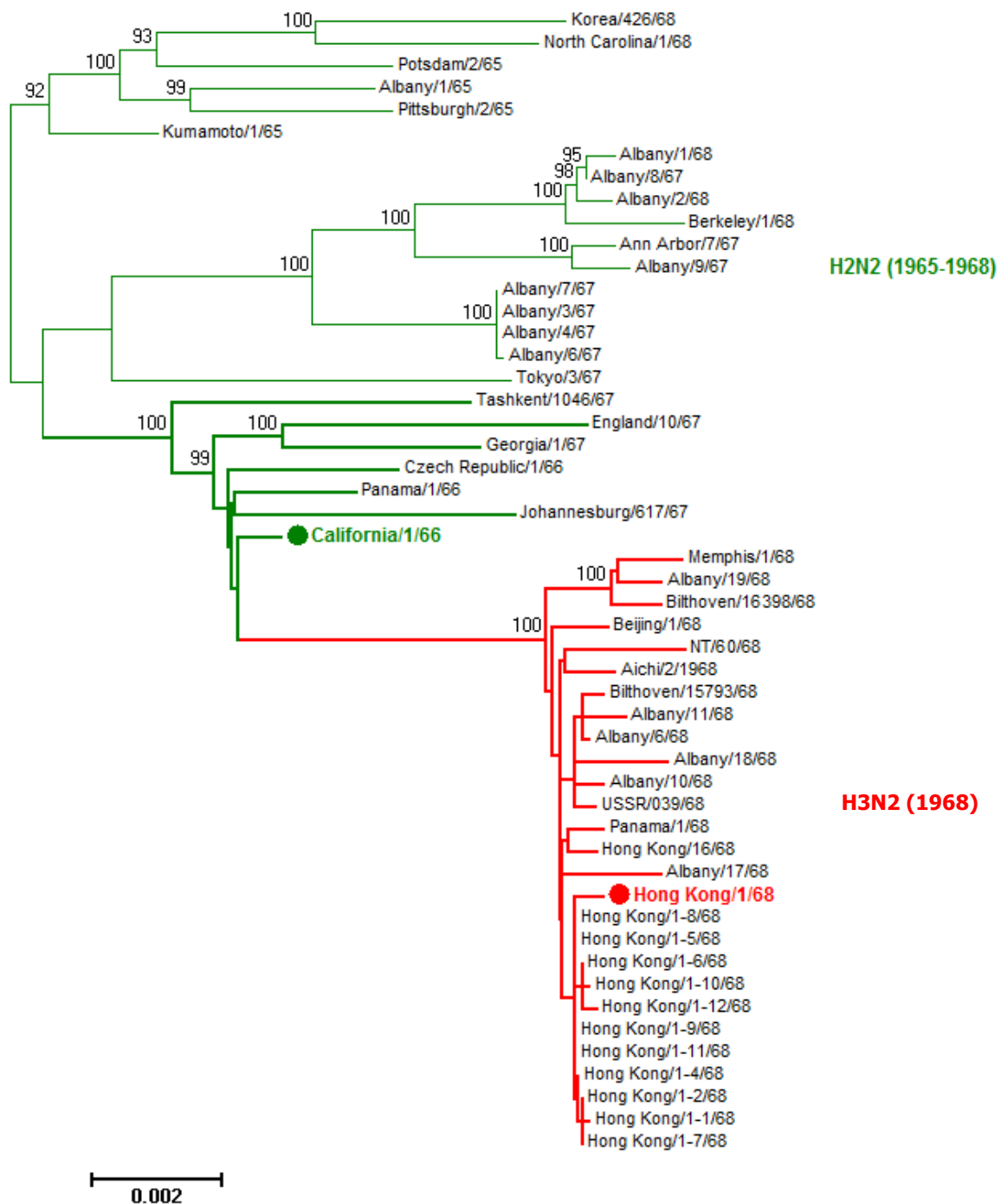


Abb. IV.2: Phylogenetischer Stammbaum der konkatenierten Gensegmente PB2-PA-NP-NA-M-NS humaner H2N2 Viren, isoliert in den Jahren 1965 bis 1968 (grün), und den pandemischen HK68-Viren (rot). Die zu den pandemischen HK68-Viren am nächsten verwandten humanen H2N2 Viren sind durch **dicke, grüne Stammbaumäste** dargestellt. Das zum HK68-Virus (**roter Punkt, rot hervorgehoben**) nächstverwandte humane H2N2-Virus A/California/1/66 (H2N2) wurde in **grün hervorgehoben** und mit einem **grünen Punkt** gekennzeichnet. Die Erstellung des Stammbaums erfolgte mit Hilfe der Mega6-Software (Tamura *et al.*, 2013) unter Verwendung der Minimal Evolution Methode. Zur Berechnung der statistischen Signifikanz wurde eine Bootstrap-Analyse mit 100 Wiederholungen durchgeführt. Die Anzahl der Stammbaumberechnungen ist an den Knotenpunkten angegeben.

Im Rahmen der phylogenetischen Stammbaumanalyse konnte eine Gruppe von sieben humanen H2N2 Viren identifiziert werden, welche am nächsten verwandt zu dem pandemischen HK68-Virus sind und somit als potentielle humane H2N2 Ersatzvorläuferviren des pandemischen HK68-Virus in Frage kommen (Abb. IV.2). Diese Gruppe umfasst die Viren A/California/1/66, A/Johannesburg/617/67, A/Panama/1/66, A/Czech Republic/1/66, A/Georgia/1/67, A/England/10/67 und A/Tashkent/1046/67. Phylogenetisch war innerhalb dieser Gruppe das A/California/1/66 Virusisolat am nächsten verwandt zu dem pandemischen HK68-Virus. Die Sequenzen der im Stammbaum identifizierten nächst verwandten humanen H2N2 Virusisolate wurden unter Verwendung des Programms Bioedit (Hall, 1999) mit denen des pandemischen HK68-Virus verglichen und die Anzahl der Nukleotid- und Aminosäureaustausche pro Gensegment bzw. viralem Protein bestimmt (Tab. IV.1).

Tab. IV.1: Anzahl der Nukleotid-/Aminosäureaustausche zwischen den Gensegmenten des pandemischen HK68-Virus und seinen phylogenetisch nächst verwandten humanen H2N2 Viren. In **schwarz** ist die Anzahl der Nukleotidaustausche je Gensegment und in **blau** ist die Anzahl der Aminosäureaustausche je viralem Protein angegeben.

	PB2	PA	NP	NA	M/M1/M2	NS/NS1/NS2	PB1/PB1/N40/PB1-F2
A/California/1/66	17/3	17/2	7/4	7/2	2/0/0	3/2/0	152/13/13/11
A/Panama/1/66	19/4	20/3	7/4	8/3	6/2/2	5/2/0	152/13/13/11
A/Czech Republic/1/66	18/4	22/3	12/4	10/4	3/0/1	5/4/0	157/13/13/11
A/England/10/67	25/6	29/5	15/4	14/3	10/2/1	7/4/0	153/13/13/12
A/Tashkent/1046/67	27/4	31/6	16/8	11/5	4/0/0	6/1/1	154/12/12/12
A/Johannesburg/617/67	22/4	27/5	13/5	17/7	4/0/0	5/4/1	156/12/12/12
A/Georgia/1/67	28/6	23/4	8/5	15/6	3/0/1	6/3/0	154/13/13/14

Wie Tab. IV.1 zu entnehmen ist, weist das humane H2N2 Virusisolat A/California/1/66 (H2N2) die wenigsten Nukleotid- und Aminosäureaustausche im Vergleich zu dem pandemischen HK68-Virus auf und konnte somit als dasjenige humane H2N2 Virusisolat identifiziert werden, welches phylogenetisch am nächsten verwandt zu dem unbekannten humanen H2N2 Vorläufervirus ist. Das Virusisolat A/California/1/66 (Cal66) diente im weiteren Verlauf dieser Arbeit als humanes Ersatzvorläufervirus für das unbekannte, an der Reassortierung beteiligte humane H2N2 Vorläufervirus.

IV.2 Generierung rekombinanter Influenza-A-Viren mittels Reverser Genetik

In der molekularen Virologie bedeutet Reverse Genetik die Generierung infektiöser Viren aus klonierter viraler cDNA. Die mit dieser Methode generierten Viren werden als Rekombinanten bezeichnet. Zur Generierung rekombinanter Viren werden Plasmide in Säugetierzellen transfiziert, welche für die einzelnen viralen Gensegmente kodieren. Dieser Prozess wird auch als „Virus-Rescue“ bezeichnet. Hierdurch ist ein Austausch einzelner Gensegmente und somit die Herstellung von Reassortanten möglich. In der vorliegenden Arbeit wurden Reassortanten, die sich im Ursprung ihrer PB1- und HA-Gensegmente unterscheiden, nach dem sogenannten „8-Plasmid-System“ nach Hoffmann *et al.*, 2000, 2001 (III.3.1; Abb. III.3 und Abb. IV.3) hergestellt.

Die Remodellierung der Pandemie von 1968, ausgehend von dem humanen H2N2 Vorläufervirus machte es erforderlich, dass bei der Herstellung der rekombinanten Viren die Gensegmente des humanen Ersatzvorläufervirus A/California/1/66 (H2N2) verwendet wurden. Da es sich bei diesem Virus um ein humanes Influenza-Virus des Subtyps H2N2 handelt, das seit 1968 nicht mehr in der menschlichen Bevölkerung zirkuliert, wurden alle nachfolgend beschriebenen Infektionsversuche unter den Bedingungen der Biologischen Sicherheitsstufe 3 (BSL-3) durchgeführt.

IV.2.1 Etablierung des reversen Genetiksystems für A/California/1/66 (H2N2)

Zur Herstellung rekombinanter Viren wurde die virale cDNA der acht Gensegmente des Cal66-Virus in das Plasmid pHW2000 kloniert. Hierfür wurde die virale RNA isoliert und mittels reverser Transkription, unter Verwendung des Influenza-spezifischen Uni12-Primers, in cDNA umgeschrieben. Die Amplifikation der einzelnen Gensegmente erfolgte mit Hilfe von segment-spezifischen Primern (Hoffmann *et al.*, 2001). Nach Ligation in das Plasmid pHW2000 wird die virale cDNA sowohl von einem humanen RNA-Polymerase I Promotor mit murinem Terminator, als auch von einem RNA-Polymerase II Promotor mit Polyadenylierungssignal flankiert (Hoffmann *et al.*, 2000). Aufgrund der Orientierung der beiden Transkriptionseinheiten im Vektor, wird nach Transfektion der Vektoren in Säugetierzellen sowohl die Synthese von viraler RNA (vRNA), als auch die Expression der viralen Proteine (mRNA-Synthese) gewährleistet (Abb. IV.3).

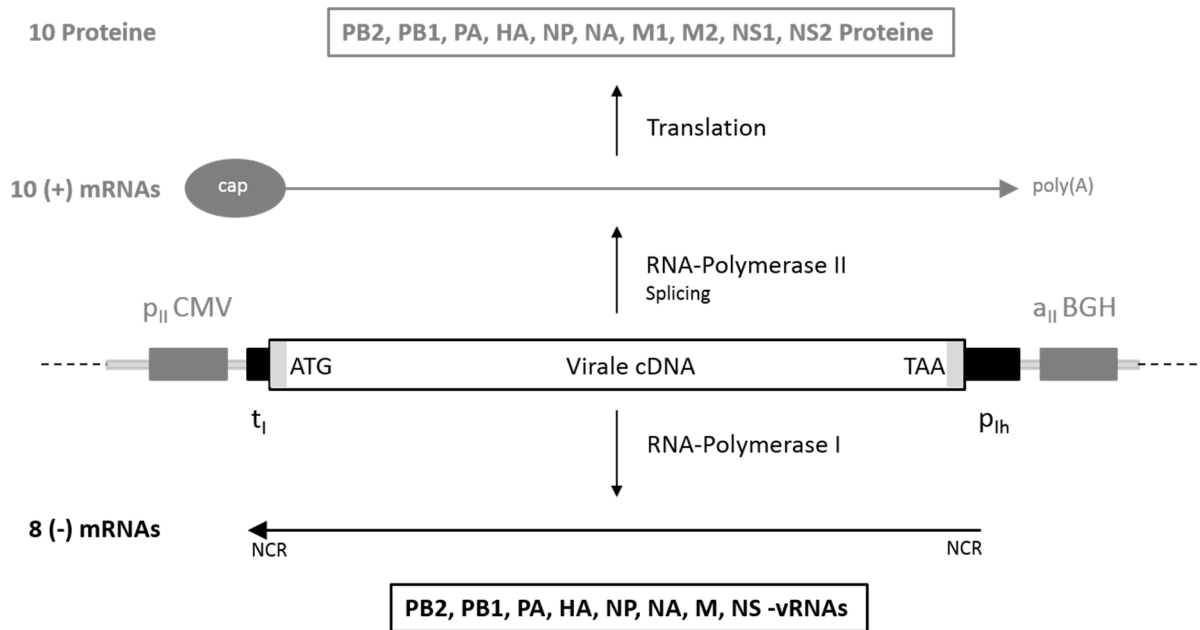


Abb. IV.3: Organisation der Pol I-Pol II-Transkriptionseinheiten im Vektor pHW2000 nach Hoffmann *et al.*, 2000. Zur Expression von vRNA ist die virale cDNA aller acht viralen Gensegmente zwischen einem humanen RNA-Polymerase I Promotor (p_{1h}) und einem murinen Terminator (t_i) im pHW2000-Vektor inseriert. Diese Pol I-Transkriptionseinheit (**schwarz**) wird von einer Pol II-Transkriptionseinheit (**dunkelgrau**) flankiert. Die Pol II-Transkriptionseinheit besteht aus dem RNA-Polymerase II Promotor des Cytomegalievirus (p₁₁ CMV) und des Polyadenylierungssignals des bovinen Wachstumshormons (*bovine growth hormone*) (a₁₁ BGH). Nach Transfektion wird somit ausgehend von einem Expressionsplasmid, sowohl virale RNA durch die zelluläre RNA-Polymerase I, als auch virale mRNA für die Protein-Synthese durch die zelluläre RNA-Polymerase II synthetisiert.

IV.2.2 Generierung der rekombinanten Cal66-Viruspaare PB1 und HA+PB1

Um den Einfluss des aviären PB1 Gens auf die virale Replikations- und Übertragungseffizienz untersuchen zu können, wurden basierend auf dem humanen Ersatzvorläufervirus Cal66 die beiden Viruspaare PB1 und HA+PB1 hergestellt, deren Viren sich lediglich im Ursprung des PB1-Gens unterscheiden (Tab. IV.2).

Da neben dem humanen H2N2 Vorläufervirus, auch das aviäre H3-Virus, welches unmittelbar an der Reassortierung beteiligt war, unbekannt ist, wurden zur Remodellierung der Pandemie die Gensegmente derjenigen Viren verwendet, welche phylogenetisch zu den an der Reassortierung beteiligten Viren am nächsten verwandt sind. Als humane Gensegmente wurden daher die Gensegmente des Cal66-Virus verwendet, welches wie in Abschnitt IV.1 beschrieben am nächsten verwandt zu dem unbekannten humanen H2N2 Vorläufervirus ist. Als aviäre Gensegmente dienten die HA- und PB1-Gensegmente des pandemischen HK68-Virus, welches eines der frühesten pandemischen Virusisolate darstellt und somit als direkter

Nachfahre des unbekannten aviären H3-Virus angesehen werden kann. Um untersuchen zu können, ob bereits der alleinige Austausch des humanen PB1-Gensegments gegen das aviäre PB1-Gensegment einen Einfluss auf die virale Replikations- und Übertragungseffizienz hat, wurde das PB1-Paar generiert (Tab. IV.2). Dieses umfasst die beiden Viren rCal66 und rCal-PB1_{HK}. Bei dem rCal66-Virus handelt es sich um das rekombinante Wildtypvirus, das alle acht Gensegmente des A/California/1/66 Virus trägt, während das rCal-PB1_{HK}-Virus eine 7+1 Reassortante darstellt, in der das humane PB1-Gen des Cal66-Virus gegen das aviäre PB1-Gen des pandemischen HK68-Virus ausgetauscht wurde.

Da bereits Kawaoka *et al.*, 1989 die Hypothese aufgestellt haben, dass möglicherweise Interaktionen zwischen den aviären PB1- und HA-Gensegmenten des pandemischen HK68-Virus bestehen könnten und neuere Studien die Hypothese, bezüglich bestehender Interaktionen zwischen den Gensegmenten unterstützen (Noda *et al.*, 2006; Marsh *et al.*, 2007; Hutchinson *et al.*, 2009; Noda *et al.*, 2012; Fournier *et al.*, 2012), wurde zusätzlich das HA+PB1 Paar generiert. In diesem wurde das PB1-Gensegment im Hintergrund des aviären HA-Gensegments des pandemischen HK68-Virus, sowie den restlichen sechs Gensegmenten des Cal66-Virus ausgetauscht. Das HA+PB1-Paar umfasst die beiden Viren rCal-HA_{HK} und rCal-(HA+PB1)_{HK}. Hierbei stellt das rCal-HA_{HK}-Virus eine 7+1 Reassortante dar, welche das aviäre HA-Gensegment des HK68-Virus, sowie die restlichen sieben Gensegmente des Cal66-Virus trägt, während das rCal-(HA+PB1)_{HK}-Virus, analog dem pandemischen HK68-Virus eine 6+2 Reassortante darstellt, die neben dem aviären HA-Gen ein PB1-Gen aviären Ursprungs trägt (Tab. IV.2).

Die rekombinanten Viren beider Viruspaare wurden mit Hilfe des „8-Plasmid-Systems“ nach Hoffmann *et al.*, 2000, 2001 hergestellt (III.3.1; Abb. III.3 und Abb. IV.3). Um sicherzustellen, dass die offenen Leserahmen der rekombinant hergestellten Viren mit den Gensegmenten der jeweiligen Wildtypisolate übereinstimmen, wurde die virale RNA der rekombinanten Viren isoliert und die offenen Leserahmen aller acht viralen Gensegmente vollständig sequenziert (III.3.5). Zur besseren Datenvalidierung wurden für die Viren beider Viruspaare zwei Virusstocks unabhängig voneinander angelegt und anschließend charakterisiert.

Tab. IV.2: Genotypen der rekombinant hergestellten A/California/1/66-Viren. Die Gensegmente humanen Ursprungs des Ersatzvorläufervirus A/California/1/66 sind mit Cal66 gekennzeichnet (**grün**), während die Gensegmente aviären Ursprungs des pandemischen A/Hong Kong/1/68 Virus mit HK68 gekennzeichnet sind (**rot**).

Gensegment	PB1-Paar		HA+PB1-Paar	
	rCal66	rCal-PB1 _{HK}	rCal-HA _{HK}	rCal-(HA+PB1) _{HK}
PB2	Cal66	Cal66	Cal66	Cal66
PB1	Cal66	HK68	Cal66	HK68
PA	Cal66	Cal66	Cal66	Cal66
HA	Cal66	Cal66	HK68	HK68
NP	Cal66	Cal66	Cal66	Cal66
NA	Cal66	Cal66	Cal66	Cal66
M	Cal66	Cal66	Cal66	Cal66
NS	Cal66	Cal66	Cal66	Cal66

IV.2.3 Generierung des rekombinanten Viruspaares HK68

Um die Daten, welche insbesondere mit dem rCal66-Viruspaar HA+PB1 erzielt wurden, besser validieren zu können, wurde das HK68-Paar generiert (Tab. IV.3). Im Gegensatz zu den beiden rCal66-Viruspaaren, die eine Remodellierung der Entstehung der Pandemie von 1968 ermöglichen, ist mit Hilfe des HK68-Viruspaares eine Rückverfolgung der Entstehung der Pandemie, ausgehend von dem pandemischen HK68-Virus möglich.

Das HK68-Viruspaar besteht aus den Viren rHK68 und rHK-PB1_{Cal} (Tab. IV.3). Hierbei handelt es sich bei dem rHK68-Virus um das rekombinante HK68 Wildtypvirus, während das rHK-PB1_{Cal}-Virus eine 7+1 Reassortante darstellt, in der das aviäre PB1 Gensegment des pandemischen HK68-Virus gegen das humane PB1 Gensegment des Cal66-Virus ausgetauscht wurde. Wie in Abschnitt IV.2.2 für die rekombinanten Cal66-Viren beschrieben, wurden die Viren des HK68-Viruspaares ebenfalls mit Hilfe des „8-Plasmid-System“ nach Hoffmann *et al.*, 2000, 2001 (III.3.1; Abb. III.3 und Abb. IV.3) generiert und anschließend charakterisiert.

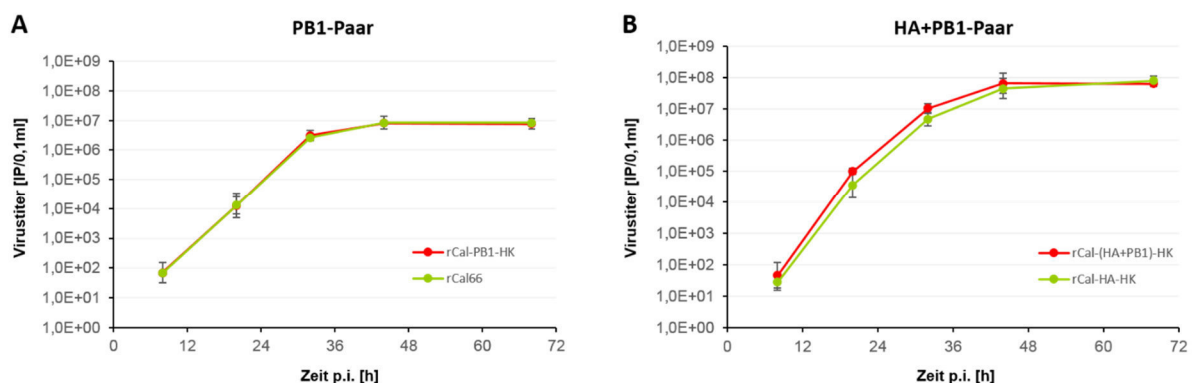
Gensegment	HK68-Paar	
	rHK68	rHK-PB1 _{Cal}
PB2	HK68	HK68
PB1	HK68	Cal66
PA	HK68	HK68
HA	HK68	HK68
NP	HK68	HK68
NA	HK68	HK68
M	HK68	HK68
NS	HK68	HK68

Tab. IV.3: Genotypen der rekombinant hergestellten A/Hong Kong/1/68 Viren. Die Gensegmente aviären Ursprungs des pandemischen A/Hong Kong/1/68 Virus sind mit HK68 gekennzeichnet (**rot**), während die Gensegmente humanen Ursprungs des Ersatzvorläufervirus A/California/1/66 mit Cal66 gekennzeichnet sind (**grün**).

IV.3 Einfluss des aviären PB1-Gens auf die virale Replikationseffizienz in humanen Lungenkarzinom-Epithelzellen (Calu-3 Zellen)

IV.3.1 Wachstumsverhalten der Viruspaare PB1, HA+PB1 und HK68

Nach Generierung der rekombinanten Cal66- und HK68-Viren mittels reverser Genetik wurde der Einfluss des aviären PB1-Gens auf die virale Replikationseffizienz untersucht. Hierfür wurde zunächst das Wachstumsverhalten der rekombinanten Viren in humanen Atemwegs-Epithelzellen (Calu-3 Zellen) untersucht (III.3.7; Abb. IV.4).



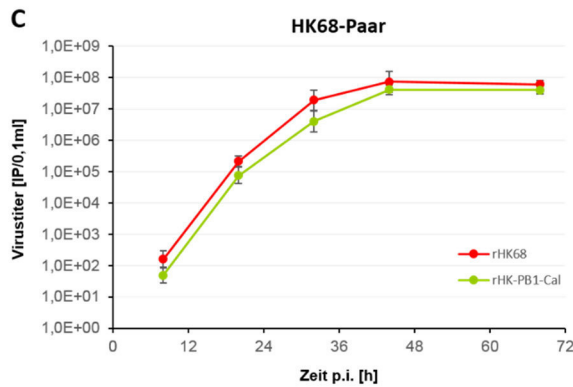


Abb. IV.4: Wachstumsverhalten der Viruspaare (A) PB1, (B) HA+PB1 und (C) HK68 in Calu-3-Zellen. Viren mit PB1_{HK} sind in **rot** und Viren mit PB1_{Cal} in **grün** dargestellt. Die Zellen wurden mit einer MOI von 0,01 infiziert und bei 37°C inkubiert. Zu definierten Zeitpunkten wurde virushaltiger Überstand abgenommen und der Virustiter mittels Einzyklischer Replikation (III.3.6.2) bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte mit 95% Konfidenzintervallen eines repräsentativen Versuchs der in Dreifachbestimmung durchgeführt wurde.

In Hinblick auf das Wachstumsverhalten der Viren mit aviärem PB1_{HK} und der Viren mit humanem PB1_{Cal} konnte in keinem der Viruspaare ein Unterschied festgestellt werden.

Daraus kann der Schluss gezogen werden, dass sofern sich die Viren mit aviärem und humanem PB1 hinsichtlich ihrer Replikationseffizienz unterscheiden, die replikativen Unterschiede gering sind und möglicherweise nur unter kompetitiven Bedingungen nachgewiesen werden können.

IV.3.2 Charakterisierung der in den kompetitiven Replikations-Experimenten erhaltenen Virusmischungen

Da sich die Viren mit aviärem und humanem PB1 bei Einzelinfektion von Calu-3-Zellen nicht hinsichtlich ihres Wachstumsverhaltens unterschieden haben (Abb. IV.4), sollte im Folgenden die natürliche Situation während der Reassortierung simuliert werden. Bei der Reassortierung pandemischer Influenza-Viren infizieren zwei genotypisch unterschiedliche Viren eine einzelne Zelle. Hierbei kommt es auf Grund der Segmentierung des viralen Genoms bei der Verpackung der Gensegmente in Nachkommenviren zu einer Reassortierung der Gensegmente. Es wird angenommen, dass dasjenige Virus nach Reassortierung in der Viruspopulation dominiert, welches eine erhöhte virale Replikationseffizienz aufweist.

Um zu untersuchen, ob Viren mit aviärem PB1 unter kompetitiven Bedingungen effizienter replizieren als Viren mit humanem PB1, wurden sowohl Koinfektions-Experimente (III.3.9), als auch kompetitive Rescue-Experimente (III.3.8) in Calu-3-Zellen durchgeführt. Die im Rahmen

$$\text{Anteil der Viren mit aviärem PB1}_{\text{HK}} = \frac{\text{Peak-Höhe (PB1}_{\text{HK}})}{[\text{Peak-Höhe (PB1}_{\text{HK}}) + \text{Peak-Höhe (PB1}_{\text{Cal}})]}$$

bestimmt.

Um eine Aussage darüber treffen zu können, ob und zu welchem Grad das Virus mit PB1_{HK} das Vergleichsvirus mit PB1_{Cal} aus der Virusmischung verdrängt hat, wurde für alle zehn Doppelpeak-Positionen das Verhältnis der Peak-Höhe bestimmt und davon der Mittelwert gebildet. Das hierbei erhaltene mittlere Verhältnis der Peak-Höhe für PB1_{HK} (0 – 1) wurde als der Anteil der Viren mit PB1_{HK} in den Virusmischungen angenommen. Entsprechend der oben dargestellten Formel gilt: Je höher das mittlere Verhältnis der Peak-Höhe für PB1_{HK}, desto mehr Viren mit PB1_{HK} sind in den erhaltenen Virusmischungen enthalten und umso größer ist der replikative Vorteil der durch das aviäre PB1_{HK} vermittelt wird.

Um sicherzugehen, dass anhand der Höhe von Sequenz-Peaks an Doppelpeak-Positionen der Anteil der Viren mit PB1_{HK} akkurat quantifiziert werden kann, wurde eine Kalibrierungskurve erstellt (Abb. IV.6). Hierfür wurden die Viren des HA+PB1-Paares zu einem Virustiter von 5x10⁴ PFU/ml in Infektionsmedium verdünnt. Dieser Titer entspricht dem viralen Titer der im Rahmen der kompetitiven Infektions- und Übertragungsexperimente mindestens erreicht wird. Ausgehend von zwei reinen Virusverdünnungen der Viren mit PB1_{HK} oder PB1_{Cal} wurde eine Kalibrierungskurve erstellt, in der sich der Anteil der beiden zu vergleichenden Viren um jeweils 5% verändert.

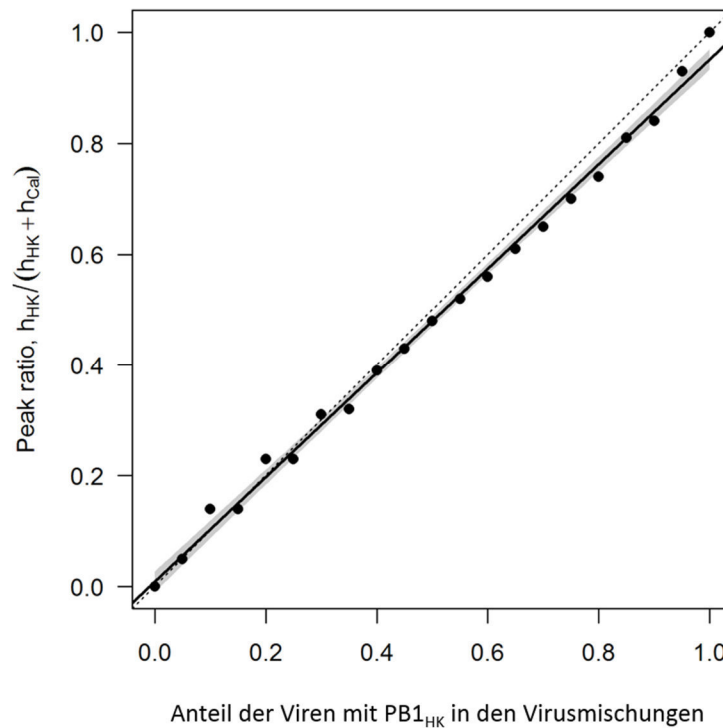


Abb. IV.6: Kalibrierungskurve zur Ermittlung der Genauigkeit mit der anhand des mittleren Verhältnisses der Peak-Höhe für PB1_{HK} der Anteil der Viren mit PB1_{HK} quantifiziert werden kann. Die Kalibrierungskurve zeigt, dass das mittlere Verhältnis der Peak-Höhe für PB1_{HK} ($h_{HK}/[h_{HK}+h_{Cal}]$) linear korreliert mit dem in den Virusmischungen enthaltenen Anteil der Viren mit PB1_{HK}. **X-Achse:** artifizuell hergestellte Virusmischungen mit genau bekanntem Anteil des Virus mit PB1_{HK}; **Y-Achse:** ermitteltes mittleres Verhältnis der Peak-Höhe für PB1_{HK} ($h_{HK}/h_{HK}+h_{Cal}$); **schwarze Linie:** lineare Regressionslinie mit angegebenem 95% Konfidenzintervall (**grau**); **gestrichelte Linie:** Identitätslinie. Diese gibt den theoretisch erwarteten Wert des mittleren Verhältnisses der Peak-Höhe für PB1_{HK} an.

Mit Hilfe der Kalibrierungskurve konnte gezeigt werden, dass das ermittelte mittlere Verhältnis der Peak-Höhe für PB1_{HK}, mit dem Anteil der Viren mit PB1_{HK} in den artifizuell hergestellten Virusmischungen linear korreliert (Abb. IV.6). Hierbei kann der Anteil der Viren mit PB1_{HK} bis zu einer Genauigkeit von 5% bestimmt werden.

IV.3.3 Koinfektions-Studien mit den Viruspaaren PB1 und HA+PB1

Um zu untersuchen ob unter kompetitiven Bedingungen Viren mit aviärem PB1 eine signifikant erhöhte virale Replikationseffizienz aufweisen, und in Folge dessen Viren mit humanem PB1 aus der Viruspopulation verdrängen können, wurden Koinfektions-Studien mit den Viruspaaren PB1 und HA+PB1 in Calu-3 Zellen durchgeführt. Hierfür wurden Calu-3 Zellen mit einer 1:1 Mischung der Viren des PB1-Paares oder des HA+PB1-Paares bei einer Infektionsdosis von 1.000 PFU/0,5 ml inokuliert. Nach 72 h wurden die virushaltigen

Zellkulturüberstände geerntet und zur Infektion einer weiteren Passage verwendet. Nach drei Passagen auf Calu-3 Zellen wurde die virale RNA extrahiert und die genotypische Zusammensetzung der passagierten Virusmischung durch Sanger-Sequenzierung des PB1-Gensegments bestimmt (IV.3.2). Um sicher zu stellen, dass die 1:1 Virusmischung welche zur initialen Infektion der Zellen verwendet wurde, gleiche Mengen beider Viren enthielt, wurde ein Teil dieser Mischung ebenfalls charakterisiert.

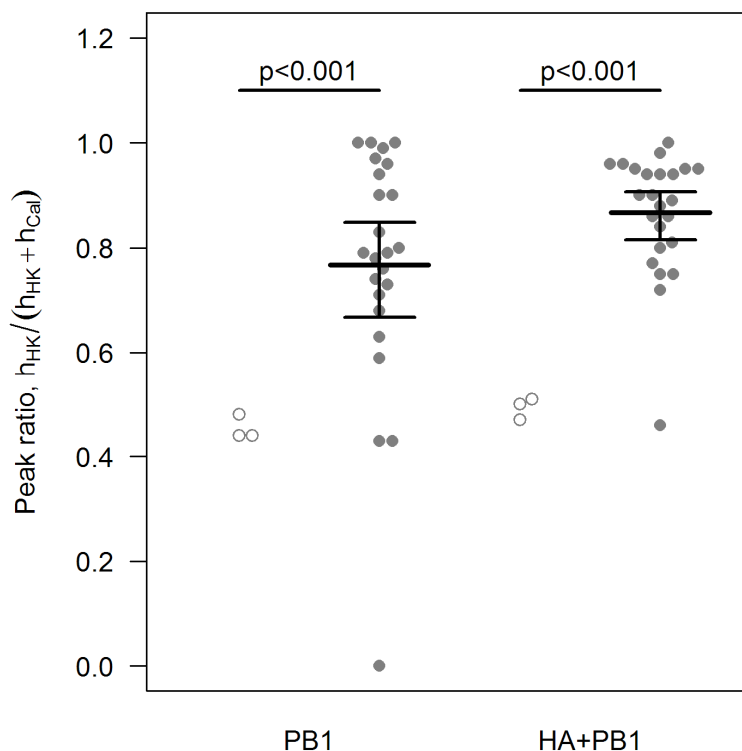


Abb. IV.7: Koinfektions-Studien mit den Viruspaaren PB1 und HA+PB1 in Calu-3 Zellen. Für die Koinfektions-Studien wurden die Viren des PB1-Paars und des HA+PB1-Paars im Verhältnis 1:1 gemischt. Je Viruspaar und Virusstock wurden pro Experiment acht Replikate über drei Passagen in Calu-3-Zellen passagiert. Die zur Inokulation verwendeten initialen Virusmischungen (○), sowie die je Replikat erhaltenen Virusmischungen (●) wurden mittels Sanger-Sequenzierung charakterisiert (IV.3.2) und das mittlere Verhältnis der Peak-Höhe für PB1_{HK} bestimmt. Dargestellt sind die kombinierten Daten aus zwei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten, die mit ein bzw. zwei unabhängig voneinander hergestellten Virusstocks erzielt wurden. Die in der Abbildung angegebenen p-Werte beziehen sich auf die Nullhypothese, gemäß der Erwartung dass sich die initialen Virusmischungen (○) von den Replikaten (●) nicht unterscheiden. Die mittlere adjustierte Differenz zwischen dem PB1- und HA+PB1-Paar beträgt 0,06 (-0,04...0,17), p=0,254. Die Rohdaten der einzelnen Experimente sind im Anhang dieser Arbeit aufgeführt.

In den Koinfektions-Studien konnte sowohl für das PB1-Paar, als auch für das HA+PB1-Paar beobachtet werden, dass die nach drei Passagen auf Calu-3 Zellen erhaltenen Virusmischungen signifikant mehr Virus mit PB1_{HK} enthielten, als in den zur Inokulation der

Zellen verwendeten initialen 1:1-Virusmischungen enthalten war. Dies deutet darauf hin, dass die Viren mit PB1_{HK} die Viren mit PB1_{Cal} auf Grund einer erhöhten viralen Replikationseffizienz aus den Virusmischungen verdrängt haben. Ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den beiden Viruspaaren konnte nicht nachgewiesen werden (Abb. IV.7). Diese Daten lassen darauf schließen, dass das aviäre PB1-Gen die virale Replikationseffizienz des pandemischen HK68-Virus erhöht haben könnte. Dies erfolgte vermutlich unabhängig von der Gegenwart des homologen HA_{HK}-Gens.

IV.3.4 Kompetitive Rescue-Experimente mit den Viruspaaren PB1 und HA+PB1

Nachdem im Rahmen der Koinfektions-Studien gezeigt werden konnte, dass Viren mit aviärem PB1 eine erhöhte virale Replikationseffizienz aufweisen, sollte mit Hilfe von kompetitiven Rescue-Experimenten untersucht werden, ob bei Reassortierung entstehende Viren mit aviärem PB1 ebenfalls eine effizientere virale Replikation aufweisen und in Folge dessen Viren mit humanem PB1 aus der Viruspopulation verdrängen können.

Für die kompetitiven Rescue-Experimente wurden 293T-Zellen mit einer 1:1 Mischung der PB1-Plasmide transfiziert, welche für das aviäre PB1-Gen des HK68-Virus und das humane PB1-Gen des Cal66-Virus kodieren. Zudem wurden sechs Plasmide kotransfiziert, welche für die Gensegmente humanen Ursprungs des Cal66-Virus kodieren, sowie abhängig vom zu untersuchenden Viruspaar entweder das HA-Plasmid, welches für das humane HA des Cal66-Virus (PB1-Paar) oder das aviäre HA des HK68-Virus (HA+PB1-Paar) kodiert. Zwei Tage nach Transfektion wurden die virushaltigen Zellkulturüberstände zur Infektion von Calu-3 Zellen verwendet und drei Tage nach Infektion wurde die genotypische Zusammensetzung der kompetitiv hergestellten Virusmischungen mittels Sanger-Sequenzierung des PB1-Gensegments bestimmt (IV.3.2).

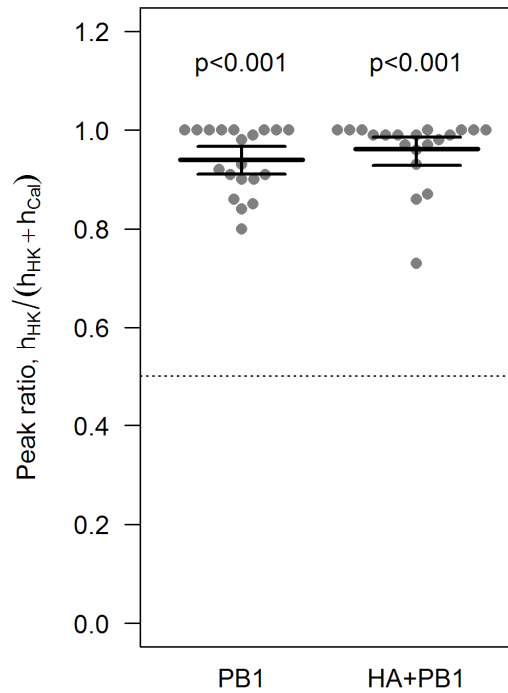


Abb. IV.8: Kompetitive Rescue-Experimente mit den Viruspaaren PB1 und HA+PB1 in Calu-3 Zellen bei einem PB1-Plasmidverhältnis von 1:1 (PB1_{HK} zu PB1_{Cal}). In den kompetitiven Rescue-Experimenten wurden die Viren des PB1-Paares und des HA+PB1-Paares kompetitiv hergestellt. Hierfür wurden 293T-Zellen mit einer 1:1 Mischung der PB1_{Cal}- und PB1_{HK}-Plasmide, entweder dem HA_{Cal}-Plasmid (PB1-Paar) oder dem HA_{HK}-Plasmid (HA+PB1-Paar), sowie sechs Plasmiden, welche für die restlichen sechs Gensegmente des Cal66-Virus kodieren kotransfiziert (III.3.8). Die Zusammensetzung der nach den kompetitiven Rescue-Experimenten erhaltenen Virusmischungen wurde mittels Sanger-Sequenzierung charakterisiert (IV.3.2) und das mittlere Verhältnis der Peak-Höhe für PB1_{HK} bestimmt. Dargestellt sind die kombinierten Daten aus zwei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten, die mit zwei bzw. drei unabhängig voneinander hergestellten Plasmidstocks erzielt wurden. Die gepunktete Linie stellt das mittlere Verhältnis der Peak-Höhe für PB1_{HK} dar, das zu erwarten ist, wenn beide Viren gleich effizient replizieren. Die mittlere Differenz zwischen dem PB1- und HA+PB1-Paar beträgt 0,02 (-0,02...0,06), $p=0,306$. Die Rohdaten der einzelnen Experimente sind im Anhang dieser Arbeit aufgeführt.

In den kompetitiven Rescue-Experimenten wurde sowohl für das PB1-Paar, als auch für das HA+PB1-Paar beobachtet, dass die Viren mit PB1_{HK} wesentlich effizienter replizierten als die entsprechenden Viren mit PB1_{Cal}. Ein replikativer Unterschied zwischen den Viren des PB1- und des HA+PB1-Paares konnte erneut nicht nachgewiesen werden (Abb. IV.8).

Dies deutet darauf hin, dass die Gegenwart des homologen aviären HA-Gens keinen Einfluss auf die Replikations- und/oder Reassortierungseffizienz nimmt.

Zusammenfassend konnte somit in den Replikationsstudien gezeigt werden, dass unter kompetitiven Bedingungen, die im Falle einer Reassortierung gegeben sind, das aviäre PB1-Gen des pandemischen HK68-Virus sowohl die virale Replikationseffizienz, als auch die Reassortierungseffizienz deutlich erhöht. Dies erfolgt unabhängig vom Ursprung des HA-Gens.

IV.4 Einfluss des aviären PB1-Gens auf die virale Übertragbarkeit in Meerschweinchen

Ein weiteres wichtiges Merkmal pandemischer Influenza-Viren ist neben einer hohen Replikationseffizienz eine gute Übertragbarkeit des Virus, die es dem Virus ermöglicht sich effizient von Mensch-zu-Mensch auszubreiten. Um zu untersuchen, ob das aviäre PB1-Gen neben einer Erhöhung der viralen Replikationseffizienz auch die virale Übertragbarkeit der reassortanten Viren verbessert, wurden Kontaktübertragungs-Studien in Meerschweinchen durchgeführt.

Für diese Studien wurden Meerschweinchen als Tiermodell gewählt, da diese ähnlich den Frettchen sehr effizient mit Influenza-Viren infiziert werden können und im Gegensatz zur Maus Influenza-Viren gut auf Kontakttiere übertragen.

Die nachfolgend beschriebenen Kontaktübertragungs-Studien wurden in Kooperation mit Herrn Prof. Dr. Peter Stäheli und Herrn Dr. Dennis Rubbenstroth (Universität Freiburg) durchgeführt. Für die Kontaktübertragungs-Studien wurde das HA+PB1-Paar verwendet, welches ähnlich dem pandemischen HK68-Virus ein HA-Genesegment aviären Ursprungs trägt.

IV.4.1 Kontaktübertragungs-Studien mit dem Viruspaar HA+PB1

Zunächst wurde untersucht, ob die beiden Viren des HA+PB1-Paares, rCal-HA_{HK} und rCal-(HA+PB1)_{HK}, effizient in Meerschweinchen replizieren und diese von den inokulierten Tieren auf naive Kontakttiere übertragen werden. Hierfür wurden pro Virus jeweils vier Meerschweinchen intranasal mit einer Infektionsdosis von 10^4 PFU inokuliert. Ein Tag nach Inokulation wurden die inokulierten Meerschweinchen mit vier naiven Kontakttieren in Kontakt gebracht, mit denen diese für die folgenden sieben Tage den Käfig teilten. An den Tagen 2, 4, 6 und 8 nach Inokulation wurde den inokulierten, sowie den naiven Kontakt-Meerschweinchen zusätzlich an Tag 11 nach Inokulation, die Nase gespült. Das dabei erhaltene Material wurde gesammelt und mittels Einzyklischer-Replikation (III.3.6.2) titriert. Um sicher zu stellen, dass die Inokulation der Meerschweinchen mit einer identischen Infektionsdosis erfolgte, wurde von dem Inokulum eine 1:2-Verdünnungsreihe angefertigt und mit Hilfe eines Plaque-Tests (III.3.6.3) der Virustiter der einzelnen Inokula bestimmt.

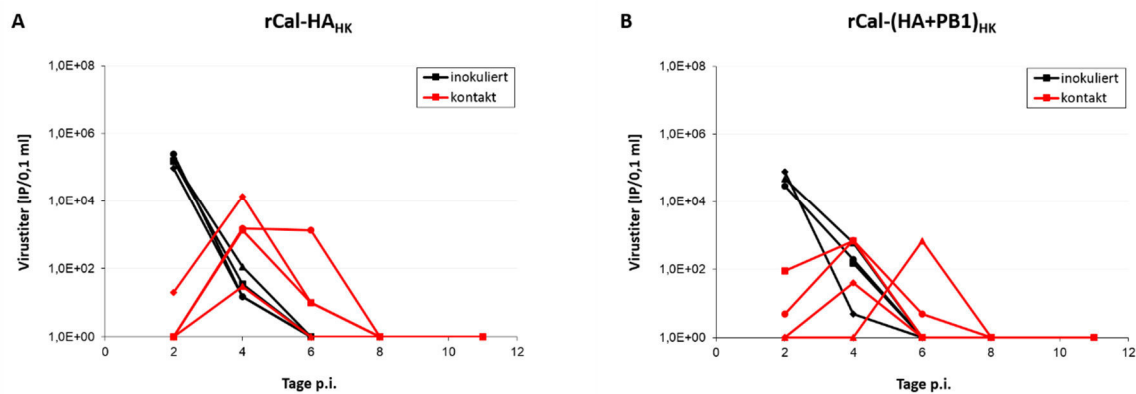


Abb. IV.9: Kontaktübertragungs-Studien in Meerschweinchen mit den Viren rCal-HA_{HK} und rCal-(HA+PB1)_{HK}. Die viralen Titer der Viren rCal-HA_{HK} (A) und rCal-(HA+PB1)_{HK} (B) des an den Tagen 2, 4, 6, 8 und 11 nach Inokulation bei den Nasenspülungen gewonnenen Materials der inokulierten Tieren (schwarz), sowie der naiven Kontakttieren (rot) wurde mit Hilfe von Einzyklischer Replikation (III.3.6.2) bestimmt.

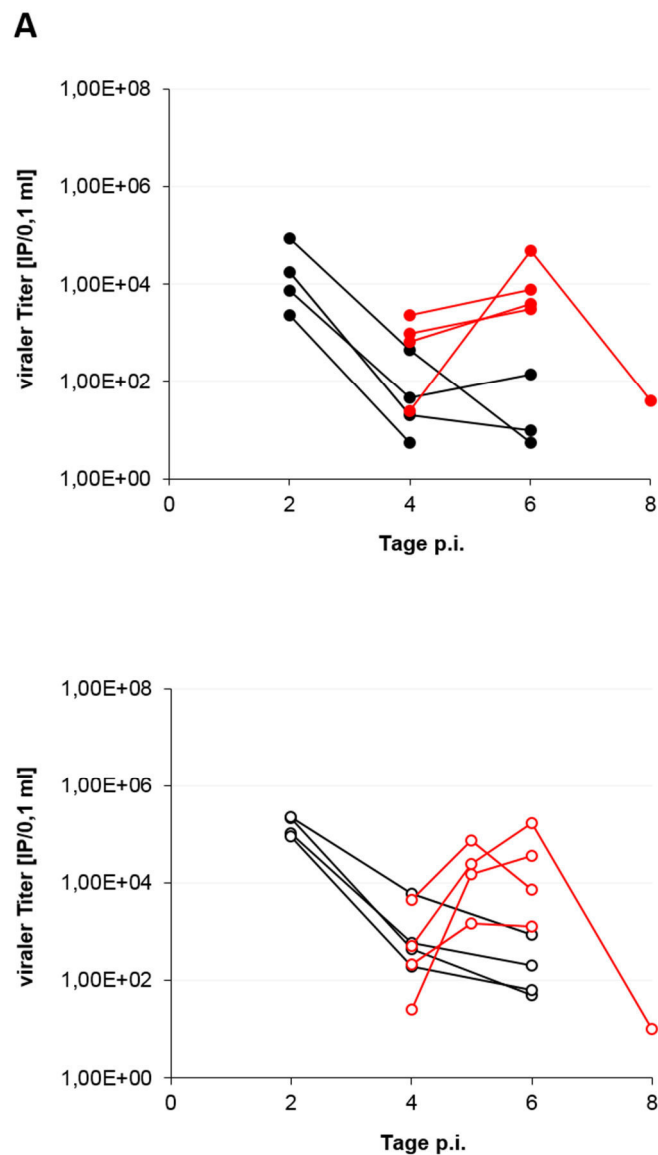
Wie Abb. IV.9 zeigt, unterscheiden sich die beiden Viren rCal-HA_{HK} und rCal-(HA+PB1)_{HK} nicht signifikant hinsichtlich ihrer Replikations- und Übertragungseffizienz in Meerschweinchen. Beide Viren replizieren in den inokulierten Tieren an Tag 2 nach Inokulation zu den höchsten viralen Titern, die bei etwa 10^5 IP/0,1ml liegen und nach Tag 2 stark abfallen. Zudem werden beide Viren gleich effizient auf die naiven Kontakttiere übertragen, die mit etwa 10^3 IP/0,1ml zwischen Tag 4 und 6 nach Inokulation die höchsten Virustiter aufweisen. In den inokulierten Tieren sind beide Viren ab Tag 6 und in den Kontakttieren ab Tag 8 nicht mehr in den Nasenspülungen nachweisbar.

IV.4.2 Kompetitive Kontaktübertragungs-Studien mit dem Viruspaar HA+PB1

Aufgrund der Beobachtung, dass sich die beiden Viren des HA+PB1-Paares bei Einzelinfektion von Meerschweinchen nicht hinsichtlich ihrer Replikations- und Übertragungseffizienz unterscheiden, wurden im Folgenden kompetitive Kontaktübertragungs-Studien durchgeführt. Mit diesen sollte untersucht werden, ob das aviäre PB1-Gen unter kompetitiven Bedingungen, wie sie unmittelbar nach der Reassortierung vorliegen, die Übertragungseffizienz des rCal-(HA+PB1)_{HK} Virus steigert. Im Rahmen dieser Versuche wurden erneut vier Meerschweinchen mit einer Infektionsdosis von 10^4 PFU einer 1:1 Mischung der Viren rCal-HA_{HK} und rCal-(HA+PB1)_{HK} inokuliert. Anschließend wurde wie in Abschnitt IV.4.1 beschrieben verfahren. Das an den Tagen 2, 4, 6, 8 und 11 nach Inokulation bei den Nasenspülungen gewonnene Material wurde mittels Einzyklischer Replikation titriert

(III.3.6.2) und die Zusammensetzung der in den Nasenspülungen enthaltenen Virusmischungen wurde mittels Sequenzierung des PB1-Gens charakterisiert (IV.3.2).

Um sicherzustellen, dass die zur Inokulation verwendete 1:1 Mischung die Viren rCal-HA_{HK} und rCal-(HA+PB1)_{HK} zu gleichen Mengen enthielt, wurden die Virustiter der Virusverdünnungen, die zur Herstellung der 1:1 Mischung eingesetzt wurden mit Hilfe eines Plaque-Tests (III.3.6.3) bestimmt. Zudem konnte mittels Charakterisierung der zur Inokulation verwendeten 1:1-Virusmischung nachgewiesen werden, dass gleiche Mengen beider Viren inokuliert wurden. Das mittlere Verhältnis der Peak-Höhe für PB1_{HK} betrug für die 1:1 Mischungen der beiden unabhängig voneinander durchgeführten kompetitiven Kontaktübertragungs-Studien 0,45 in Experiment 1 und 0,43 in Experiment 2 (Abb. IV.10 B).



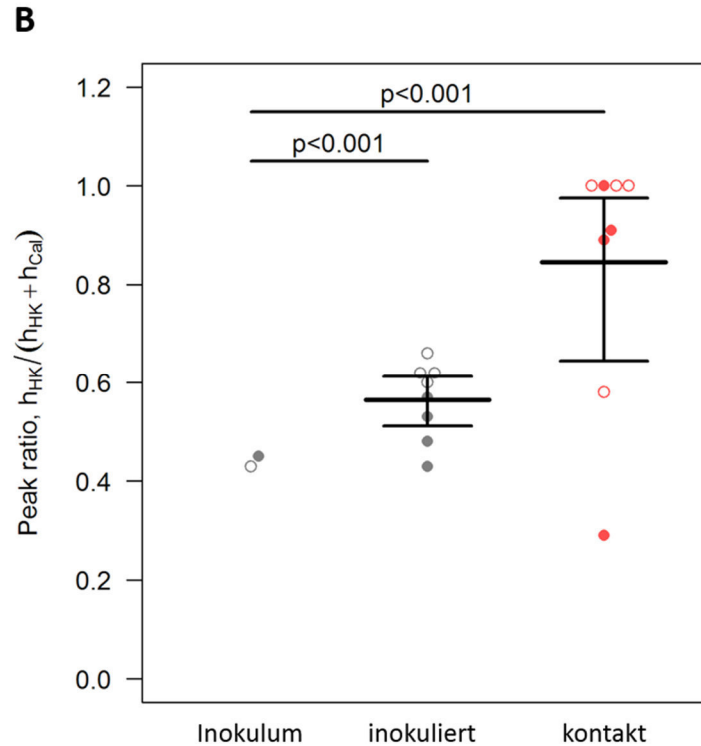


Abb. IV.10: Kompetitive Kontaktübertragungs-Studien in Meerschweinchen mit dem Viruspaar HA+PB1. (A) In zwei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten (Experiment 1: **gefüllte Kreise**; Experiment 2: **offene Kreise**) wurden vier Meerschweinchen mit einer Infektionsdosis von 10^4 PFU einer 1:1 Mischung der Viren rCal-HA_{HK} und rCal-(HA+PB1)_{HK} inokuliert. An Tag 1 nach Inokulation wurden die inokulierten Meerschweinchen mit vier naiven Kontakt-Meerschweinchen in Kontakt gebracht und an den Tagen 2, 4, 6, 8 und 11 wurden Nasenspülungen genommen. Dargestellt sind die viralen Titer des in den Nasenspülungen gewonnenen Materials der inokulierten Tiere (**schwarz**), sowie der naiven Kontakttiere (**rot**) an den Tagen 2, 4, 6, 8 und 11 nach Inokulation. **(B)** Die Charakterisierung der in den Nasenspülungen vorliegenden Virusmischungen erfolgte wie in Abschnitt IV.3.2 beschrieben, an den Tagen der höchsten Virusfreisetzung; für die inokulierten Tiere an Tag 2 nach Inokulation und für die Kontakttiere an Tag 6 nach Inokulation. Die mittlere Differenz beträgt zwischen dem Inokulum und den inokulierten Tieren: 0,124 (0,069...0,173), $p < 0,001$ und zwischen dem Inokulum und den Kontakttieren: 0,394 (0,205...0,538), $p < 0,001$. Die Rohdaten der einzelnen Experimente sind im Anhang dieser Arbeit aufgeführt.

Die Virustiter des bei den Nasenspülungen gewonnenen Materials zeigten in beiden Experimenten, dass alle inokulierten Meerschweinchen infiziert und die meisten Viren an Tag 2 nach Inokulation freigesetzt wurden (Abb. IV.10 A). Die von den inokulierten Tieren sezernierten Viren wurden effizient auf die Kontakttiere übertragen, die an Tag 6 nach Inokulation mit $10^3 - 10^5$ IP/0,1 ml die höchsten viralen Titer in beiden Experimenten aufwiesen. Um zu bestimmen, ob unter kompetitiven Bedingungen Unterschiede hinsichtlich der Übertragungseffizienz der Viren bestehen, wurden die Nasenspülungen, welche an den Tagen der höchsten Virusfreisetzung gewonnen wurden (Tag 2 nach Inokulation für die

inokulierten Tiere und Tag 6 nach Inokulation für die Kontakttiere), charakterisiert. Hierbei war zu beobachten, dass in Experiment 1 die inokulierten Tiere gleiche Mengen beider Viren freisetzten, während in Experiment 2 die inokulierten Tiere bereits geringfügig mehr Virus mit PB1_{HK} freisetzten (Abb. IV.10 B). Für die Kontakttiere wurde hingegen beobachtet, dass in drei der vier Tiere je Experiment das Virus mit PB1_{HK} signifikant über das Virus mit PB1_{Cal} dominierte, während im vierten Tier entweder beide Viren zu gleichen Mengen vorlagen oder das Virus mit PB1_{Cal} über das Virus mit PB1_{HK} dominierte.

Im Rahmen der Kontaktübertragungs-Studien konnte somit gezeigt werden, dass unter kompetitiven Bedingungen das rCal-(HA+PB1)_{HK}-Virus mit aviärem PB1 sowohl effizienter in Meerschweinchen replizieren kann (Experiment 2), als auch effizienter von den inokulierten Tieren auf die Kontakttiere übertragen wird als das rCal-HA_{HK}-Virus mit humanem PB1. Diese Daten deuten darauf hin, dass das aviäre PB1-Gen nicht nur die Replikations-, sondern auch die Übertragungseffizienz des pandemischen HK68-Virus unter kompetitiven Bedingungen, wie sie unmittelbar nach der Reassortierung vorliegen, gesteigert hat.

IV.5 Sequenzierung der Nicht-kodierenden Regionen (NCR's) und ihr Einfluss auf die virale Replikationseffizienz

Die Nicht-kodierenden Regionen (NCRs) sind an den äußersten Enden der vRNA lokalisiert und werden durch ihre Lokalisation an den 3' und 5'Enden der vRNA auch als 3'NCR bzw. 5'NCR bezeichnet. Diese flankieren die offenen Leserahmen der Gensegmente und enthalten auf Grund ihrer Funktion als Promotoren alle regulatorischen Signale für die Transkriptions- und Replikationsinitiation, sowie für die Polyadenylierung (Bae *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2003). Zudem überlappen ihre Sequenzen mit den Verpackungssignalen der Gensegmente, wodurch anzunehmen ist, dass sie ebenfalls Einfluss auf die Verpackung der Gensegmente in Nachkommenviren haben (Hutchinson *et al.*, 2010).

Da durch mehrere Studien gezeigt werden konnte, dass Mutationen in den NCR-Sequenzen wesentlichen Einfluss, sowohl auf die virale Replikation, Transkription und Polyadenylierung, wie auch auf die Verpackung der Gensegmente in Nachkommenviren nehmen können (Fodor *et al.*, 1998; Lee & Seong, 1998; Jiang *et al.*, 2010; Belicha-Villanueva *et al.*, 2012), musste in dieser Arbeit sichergestellt werden, dass keine Mutationen in den NCR-Sequenzen der

rekombinant hergestellten Viren vorliegen, welche die in Abschnitt IV.3 und IV.4 dargestellten Ergebnisse beeinflussen könnten.

Im Rahmen der Charakterisierung der rekombinant hergestellten Viren (Abschnitt IV.2.2) konnten bislang lediglich die offenen Leserahmen aller acht Gensegmente mit denen der jeweiligen Wildtypisolate verglichen werden. Ein Sequenzvergleich der Nicht-kodierenden Sequenzregionen (NCRs) war hingegen nicht möglich, da zu Beginn dieser Arbeit für die Genome der A/California/1/66 (H2N2) und A/Hong Kong/1/68 (H3N2) Wildtypisolate die NCR-Sequenzen nicht bzw. nur teilweise in den Influenza-Datenbanken zu Verfügung standen. Um dennoch sicher gehen zu können, dass in den NCR-Sequenzen keine Mutationen vorliegen, wurden nachfolgend in dieser Arbeit die NCR-Sequenzen der Wildtypisolate A/California/1/66 (H2N2) und A/Hong Kong/1/68 (H3N2) mittels 3'RACE (*Rapid Amplification of cDNA Ends*) bzw. 5'RACE sequenziert. Die hierbei erhaltenen NCR-Sequenzen wurden mit denen der in dieser Arbeit rekombinant hergestellten Viren verglichen, um sicherstellen zu können, dass keine Mutationen in den NCR-Sequenzen die bislang erzielten Ergebnisse (IV.3 und IV.4) beeinträchtigen.

IV.5.1 Sequenzierung der Nicht-kodierenden Regionen (NCR's)

Die Sequenzierung der 3'NCRs und 5'NCRs der Wildtypisolate A/California/1/66 (H2N2) und A/Hong Kong/1/68 (H3N2) erfolgte mittels 3'RACE bzw. 5'RACE (III.1.18) in Kooperation mit Herrn Prof. Dr. Georg Kochs (Universität Freiburg).

Die bei der Sequenzierung erhaltenen NCR-Sequenzen der Wildtypisolate A/California/1/66 (H2N2) und A/Hong Kong/1/68 (H3N2) sind in Abb. IV.11 dargestellt. Diese wurden mit den NCR-Sequenzen der in dieser Arbeit rekombinant hergestellten Viren verglichen.

A

	3'NCR	5'NCR
A/California/1/66 (H2N2)		
PB2		
wildtype isolate	AGCAAAAGCAGGTCATTATATCAATATG	TAA TGTGAATAGTTAAAAACGACCTGTTTCTACT
recombinant Cal66G.....
PB1		
wildtype isolate	AGCAAAAGCAGGCAACCATTGATGATG	TAGTGAATTAGCTTGCTTCATGAAAAATGCCTGTTTCTACT
recombinant Cal66G.....
PA		
	↑ Mutation „G4“	
wildtype isolate	AGCAAAAGCAGGTACTGATTGAAATG	CTATTGCTATCCACTGTCCAAAAAGTACCTGTTTCTACT
recombinant Cal66
HA		
wildtype isolate	AGCAAAAGCAGGGTTATACCATAGACAATCAAAGCATAACAATG	TGATTGTAAGTCATTTTATAATTAAAAACACCCCTGTTTCTACT
recombinant Cal66
NP		
wildtype isolate	AGCAAAAGCAGGGTAGATAATCACTCACTGAGTGACATCAAATCATG	TAA GGAAAAATACCCCTGTTTCTACT
recombinant Cal66
NA		
wildtype isolate	AGCAAAAGCAGGAGTGAAAATG	TAA GCTTCGCAATTTTAGAAAAAACTCCTGTTTCTACT
recombinant Cal66
M		
wildtype isolate	AGCAAAAGCAGGTAGATATTGAAAGATG	TAGAGCTGGAGTAAAAACTACCTGTTTCTACT
recombinant Cal66
NS		
wildtype isolate	AGCAAAAGCAGGGTGACAAAGACATAATG	TAA TGATAAAAAACACCCCTGTTTCTACT
recombinant Cal66

B

A/Hong Kong/1/68 (H3N2)		
PB1		
wildtype isolate	AGCGAAAGCAGGCAACCATTGAAATG	TAGTGAATTAGCTTGCTTCATGAAAAATGCCTGTTTCTACT
recombinant Cal66
HA		
wildtype isolate	AGCAAAAGCAGGGATAATTCTATTATCATG	TGAGTGATTAGTAATTAAAAACACCCCTGTTTCTACT
recombinant Cal66

Abb. IV.11: Sequenzvergleich der 3'NCR- und 5'NCR-Sequenzen der Wildtypisolate A/California/1/66 (H2N2) und A/Hong Kong/1/68 (H3N2) mit den in dieser Arbeit rekombinant hergestellten Viren. Die im Rahmen der 3' bzw. 5'RACE für das **(A)** A/California/1/66 (H2N2) und das **(B)** A/Hong Kong/1/68 (H3N2) Wildtypisolat erhaltenen NCR-Sequenzen sind für jedes Gensegment in der oberen Reihe dargestellt und in cRNA-Orientierung angegeben. Die entsprechenden Sequenzen der rekombinant hergestellten Viren sind darunter abgebildet. Die Start- und Stop-Codons des kodierenden Sequenzbereichs sind **gelb markiert** und die im 3'NCR des PB1_{Cal}-Gensegments identifizierte Mutation G4 der rekombinant hergestellten Viren rCal66 und rCal-HA_{HK} ist mit einem **roten Pfeil** gekennzeichnet.

Im Rahmen des Sequenzvergleichs der NCR-Sequenzen der Wildtypisolate mit denen der rekombinant hergestellten Cal66-Viren konnte beobachtet werden, dass das PB1-Gensegment des Wildtypisolats A/California/1/66 (H2N2) im 3'NCR an Position 4 ein Adenin (cRNA-Orientierung) kodiert, während das der rekombinant hergestellten Cal66-Viren an gleicher Stelle ein Guanin (cRNA-Orientierung) aufweist (Abb. IV.11). Es ist bekannt, dass an dieser Position im hochkonservierten Sequenzbereichen des 3'NCR der Gensegmente ein C/U Polymorphismus (G/A Polymorphismus in cRNA-Orientierung) in der vRNA vorliegt (I.4.1; Abb. I.4), der durch die zur Etablierung von reversen Genetik-Systemen verwendeten Hoffmann-Primer nicht berücksichtigt wird. Daher wurde die nachfolgend als „G4“ bezeichnete Mutation

der rekombinant hergestellten Cal66-Viren mit PB1_{Cal} (rCal66 und rCal-HA_{HK}) vermutlich durch Verwendung der Hoffmann-Primer bei Etablierung des reversen Genetik Systems für das A/California/1/66 (H2N2) Virus versehentlich eingefügt.

Für die übrigen Gensegmente der rekombinant hergestellten Cal66-Viren wurden im Vergleich zu den A/California/1/66- und A/Hong Kong/1/68-Wildtypisolaten keine weiteren Mutationen in den NCR-Sequenzen identifiziert (Abb. IV.11).

IV.5.2 Einfluss der NCR's auf die virale Replikationseffizienz

Nachdem mittels Sequenzierung der Wildtypvirus-NCRs und darauf folgendem Sequenzvergleich nachgewiesen werden konnte, dass in den 3'NCR des PB1_{Cal}-Gensegments der Viren rCal66 und rCal-HA_{HK} versehentlich die Mutation G4 eingefügt wurde, sollte der Einfluss dieser Mutation auf die virale Replikationseffizienz untersucht werden.

In der Literatur wurde bislang der Einfluss dieser Mutation sehr kontrovers diskutiert. Während de Wit *et al.*, 2004 beschreibt, dass diese Mutation in allen acht Gensegmenten keinen Einfluss auf die virale Replikation hat, wird durch Lee & Seong, 1998 für gleiche Mutation im NA-Gensegment beschrieben, dass ein Adenin an Position 4 (cRNA-Orientierung), wie in dieser Arbeit im PB1-Gen des A/California/1/66-Wildtypisolats gegeben, die vRNA-Synthese verzögert. Zudem konnte eine Akkumulation von mRNA beobachtet werden, die eine erhöhte Transkription vermuten lässt. Im Gegensatz dazu wurde von Jiang *et al.*, 2010 für gleiche Mutation im NS-Gensegment publiziert, dass ein Guanin an Position 4 (cRNA-Orientierung), wie in dieser Arbeit in den rekombinant hergestellten Cal66-Viren mit PB1_{Cal} gegeben, sowohl die virale Replikation, als auch die virale Transkription reduziert. Ähnliche Beobachtungen wurden erst kürzlich in einer Studie von Sun *et al.*, 2014 veröffentlicht, in der für das PB1-Gensegment hochpathogener H5N1-Viren beschrieben wurde, dass ein Adenin an Position 4, wie in dieser Arbeit im PB1-Gen des A/California/1/66-Wildtypisolats gegeben, die virale Replikation und Pathogenität in Mäusen steigert, als auch die Polymerase-Aktivität erhöht. Da insbesondere diese Studie vermuten lässt, dass ein Adenin an dieser Position im PB1-Gensegment möglicherweise auch in anderen Influenza-Subtypen die virale Replikationseffizienz steigert, war es essentiell nachzuweisen, dass die in Abschnitt IV.3 und IV.4 beobachtete reduzierte Replikations- und Übertragungseffizienz der Viren mit PB1_{Cal}, nicht auf dem versehentlich an dieser Position eingeführten Guanin (Mutation G4) beruhen.

Daher wurde nachfolgend in dieser Arbeit der Einfluss der Mutation G4 auf die virale Replikationseffizienz untersucht. Hierfür wurden die zur Generierung der rekombinant hergestellten Viren verwendeten PB1_{Cal}-Plasmide, welche ein Guanin an Position 4 im 3'NCR tragen (nachfolgend als PB1_{Cal}-G4 bezeichnet), einer zielgerichteten Mutagenese (III.1.14) unterworfen, um PB1_{Cal}-Plasmide zu generieren, die wie das Cal66-Wildtypisolat ein Adenin an Position 4 im 3'NCR tragen (PB1_{Cal}-A4). Zur besseren Datenvalidierung wurden für jedes der beiden PB1-Plasmide zwei Plasmidstocks unabhängig voneinander hergestellt und mittels Sequenzierung charakterisiert.

Der Einfluss der Mutation G4 auf die virale Replikationseffizienz wurde anschließend mit Hilfe von kompetitiven Rescue-Experimenten in Calu-3-Zellen untersucht. Hierfür wurden 293T-Zellen mit einer 1:1 Mischung des aviären (PB1_{HK}) und humanen PB1-Plasmids (entweder PB1_{Cal}-G4 oder PB1_{Cal}-A4) transfiziert. Abhängig von dem zu untersuchenden Viruspaar wurde zudem entweder das HA-Plasmid, welches für das humane HA des Cal66-Virus (PB1-Paar) oder das aviäre HA des HK68-Virus (HA+PB1-Paar) kodiert, sowie sechs Plasmide, welche für die restlichen Gensegmente des Cal66-Virus kodieren, kotransfiziert. Anschließend wurde wie in Abschnitt III.3.8 beschrieben fortgefahren. Die genotypische Zusammensetzung der erhaltenen kompetitiv hergestellten Virusmischungen wurde durch Sanger-Sequenzierung des PB1-Gens bestimmt (IV.3.2).

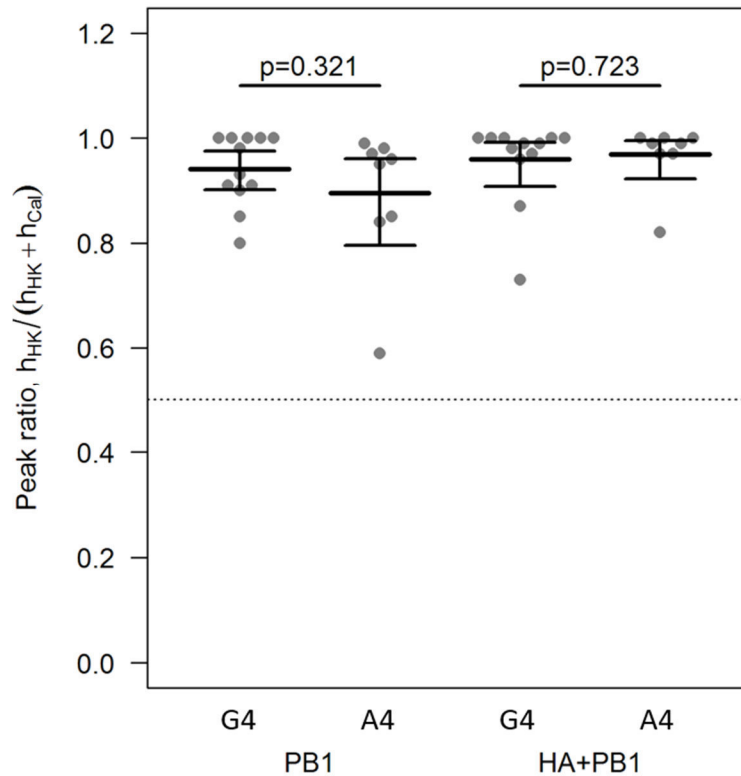


Abb. IV.12: Kompetitive Rescue-Experimente in Calu-3-Zellen zur Evaluierung des Einflusses der Mutation G4 auf die virale Replikationseffizienz. Die Viren des PB1- und HA+PB1-Paares wurden mittels reverser Genetik unter Verwendung zweier unabhängig voneinander hergestellter PB1_{Cal}-Plasmidstocks, welche jeweils entweder für ein G4 oder A4 im 3'NCR kodieren, kompetitiv hergestellt. Hierfür wurden 293T-Zellen mit einer 1:1 Mischung der PB1_{Cal}- (entweder G4 oder A4) und PB1_{HK}-Plasmide, entweder dem HA_{Cal}-Plasmid (PB1-Paar) oder dem HA_{HK}-Plasmid (HA+PB1-Paar), sowie sechs Plasmiden, welche für die restlichen sechs Gensegmente des Cal66-Virus kodieren kotransfiziert (III.3.8). Die Zusammensetzung der erhaltenen Virusmischungen wurde mittels Sanger-Sequenzierung charakterisiert (IV.3.2) und das mittlere Verhältnis der Peak-Höhe für PB1_{HK} bestimmt. Die gepunktete Linie stellt das mittlere Verhältnis der Peak-Höhe für PB1_{HK} dar, das zu erwarten ist, wenn beide Viren gleich effizient replizieren. Die mittlere Differenz zwischen G4 vs. A4 beträgt für das PB1-Paar -0,05 (-0,15...0,04), p=0,321 und für das HA+PB1-Paar 0,01 (-0,05...0,07), p=0,723. Die Rohdaten des Experiments sind im Anhang dieser Arbeit aufgeführt.

Die identifizierte Mutation G4 im 3'NCR der rekombinant hergestellten Cal66-Viren mit PB1_{Cal} hat in keinem der beiden Viruspaare einen signifikanten Einfluss auf die virale Replikationseffizienz (Abb. IV.12). Sowohl für das PB1-Paar, als auch für das HA+PB1-Paar ist zu beobachten, dass in den kompetitiv hergestellten Virusmischungen das Virus mit PB1_{HK} signifikant über das Virus mit PB1_{Cal} dominiert, unabhängig davon ob das PB1_{Cal}-Gensegment an Position 4 im 3'NCR für ein Guanin (G4) oder Adenin (A4) kodiert. Somit kann ausgeschlossen werden, dass die in Abschnitt IV.3 beobachtete reduzierte virale

Replikationseffizienz der Cal66-Viren mit PB1_{Cal} von der im 3'NCR des PB1_{Cal}-Gensegment identifizierten Mutation G4 herrührt.

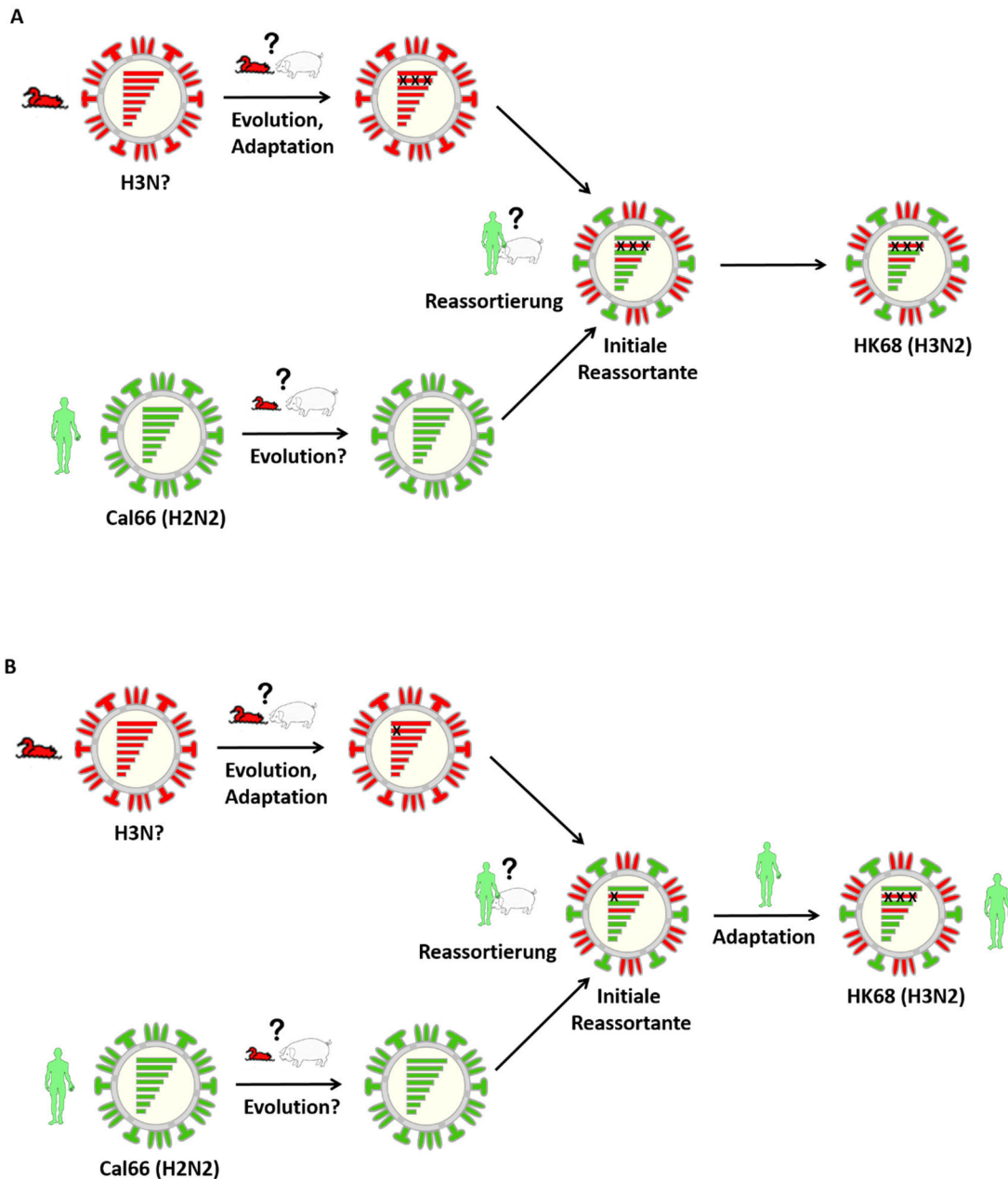
IV.6 Rekonstruktion des nicht-adaptierten aviären PB1-Gens und sein Einfluss auf die virale Replikationseffizienz

In den bisherigen Replikations- und Übertragungs-Studien konnte gezeigt werden, dass das aviäre PB1-Gensegment des pandemischen HK68-Virus unabhängig vom Ursprung des HA-Gensegments effizienter reassortiert und die virale Replikationseffizienz, sowie die virale Übertragungseffizienz in Meerschweinchen erhöht (IV.3 – IV.5). Diese Daten wurden auf Grund der Tatsache, dass das an der Reassortierung beteiligte aviäre H3-Vorläufervirus unbekannt ist, mit dem human-adaptierten aviären PB1-Gensegment des pandemischen HK68-Virus erzielt. Dieses stellt eines der frühesten pandemischen Isolate dar und kann somit als direkter Nachfahre des unbekannten aviären H3-Vorläufervirus gelten. Allerdings wird durch Verwendung des human-adaptierten aviären PB1-Gensegments des pandemischen HK68-Virus angenommen, dass das an der Reassortierung beteiligte aviäre PB1-Gensegment bereits an den Menschen adaptiert war. Jedoch ist weder bekannt ob und in welcher bzw. welchen Wirtsspezies das aviäre H3-Vorläufervirus vor der Reassortierung eine Evolution durchlaufen hat, noch ist bekannt in welcher Wirtsspezies die Reassortierung stattgefunden hat (Abb. IV.13). Somit bleibt gänzlich unbekannt, ob das an der Reassortierung beteiligte aviäre PB1-Gensegment bereits an den Menschen (Abb. IV.13 C) bzw. eine andere Wirtsspezies (Abb. IV.13 A, B) adaptiert war oder ob es aufgrund von direkter Übertragung vom Vogel auf den Menschen die nicht-adaptierte aviäre Sequenz des unbekannten aviären H3-Vorläufervirus aufwies (Abb. IV.13 C).

Im Allgemeinen sind zwei Reassortierungs-Szenarien denkbar:

1. Das aviäre H3-Vorläufervirus hat vor Reassortierung in einer oder mehreren Wirtsspezies außerhalb des Wirtsreservoirs eine Evolution durchlaufen. Hierbei hat das PB1-Gensegment alle drei (Abb. IV.13 A) bzw. einen Teil (Abb. IV.13 B) der im PB1_{HK}-Gensegment vorliegenden adaptiven Mutationen erworben.

2. Das aviäre H3-Vorläufervirus wurde direkt auf den Menschen übertragen. Hierbei wurden die adaptiven Mutationen entweder vor Reassortierung durch wiederholte direkte Übertragung des Virus auf den Menschen oder nach Reassortierung durch Adaptation des reassortanten Virus an den Menschen erworben (Abb. IV.13 C)



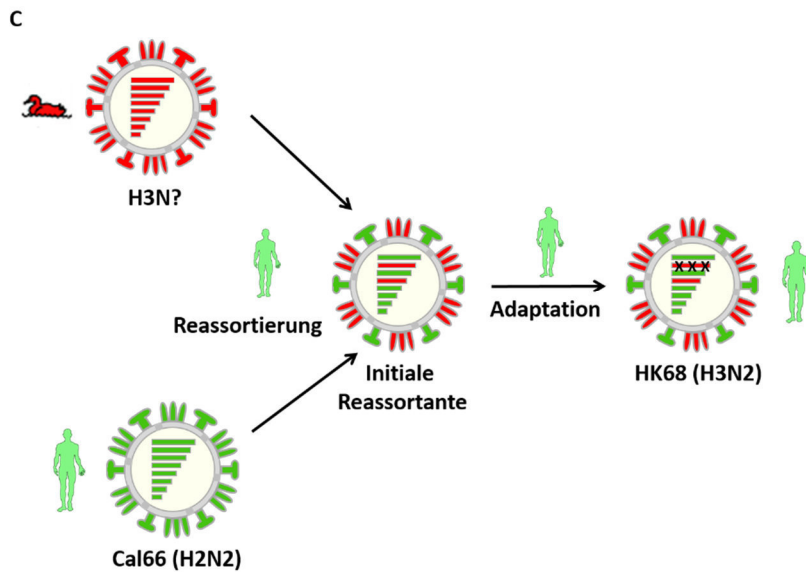


Abb. IV.13: Reassortierungs-Szenarien die zur Entstehung des pandemischen HK68-Virus geführt haben könnten. Das humane H2N2- (grün) und das aviäre H3-Vorläufervirus (rot), welche unmittelbar an der Reassortierung des pandemischen HK68-Virus beteiligt waren, sind unbekannt. Demzufolge ist ebenfalls unbekannt, ob die beiden Vorläuferviren vor der Reassortierung eine Evolution in einer oder mehreren Wirtsspezies durchlaufen haben und in welcher Wirtsspezies die Reassortierung stattfand. Im Allgemeinen sind zwei Reassortierungs-Szenarien denkbar: (A, B) Das aviäre Vorläufervirus hat vor Reassortierung eine Evolution in einer oder mehreren Wirtsspezies, wie etwa domestiziertem Geflügel oder dem Schwein durchlaufen. In diesem Fall ist denkbar, dass entweder alle adaptive Mutationen (x) in der intermediären Wirtsspezies auftraten und bereits bei Reassortierung vorhanden waren (A), oder diese sowohl vor als auch nach Reassortierung auftraten (B). Die Reassortierung kann in diesem Fall sowohl im Schwein als auch im Menschen stattgefunden haben. Sofern die Reassortierung im Schwein stattfand, ist für das humane H2N2 Vorläufervirus anzunehmen, dass auch dieses vor der Reassortierung eine Evolution in einer anderen Wirtsspezies, vermutlich dem Schwein, durchlaufen hat. (C) Im zweiten Fall könnten die beiden Vorläuferviren direkt auf den Menschen übertragen worden sein, in dem die Reassortierung stattfand. In diesem Fall sind die adaptiven Mutationen im PB1-Gensegment entweder vor der Reassortierung durch wiederholte direkte Übertragung des Virus auf den Menschen oder nach Reassortierung durch Adaptation des reassortanten Virus an den Menschen entstanden. Zudem ist nicht auszuschließen, dass ein Teil der adaptiven Mutationen sowohl vor als auch nach Reassortierung aufgetreten ist. (A, B, C) Der Einfachheit halber werden adaptive Mutationen lediglich für das aviäre PB1-Gensegment gekennzeichnet, wenngleich in den übrigen Gensegmenten des pandemischen HK68-Virus ebenfalls adaptive Mutationen aufgetreten sind.

Um die Möglichkeit zu berücksichtigen, dass an der Reassortierung ein nicht-adaptiertes aviäres PB1 beteiligt gewesen sein könnte, wurde nachfolgend untersucht, ob ein nicht-adaptiertes aviäres PB1-Gensegment dem pandemischen HK68-Virus ebenfalls einen replikativen Vorteil hätte unterbreiten können.

Da das aviäre H3-Vorläufervirus unbekannt ist, wurde zunächst die Sequenz des nicht-adaptierten aviären PB1-Gensegments rekonstruiert. Hierfür wurden die zum pandemischen HK68-Virus nächstverwandten aviären Viren mit Hilfe von BLAST- (*Basic Local Alignment Search Tool*), und phylogenetischen Stammbaumanalysen identifiziert. Durch einen

anschließenden Sequenzvergleich der PB1-Sequenzen der pandemischen HK68-Viren und der nächstverwandten aviären Viren wurde eine aviäre Konsensus-Sequenz konstruiert, welche als die nicht-adaptierte aviäre PB1-Sequenz des unbekannten aviären H3-Vorläufervirus angenommen wurde und deren Einfluss auf die virale Replikationseffizienz es zu untersuchen galt.

IV.6.1 Rekonstruktion des nicht-adaptierten aviären PB1-Gensegments des aviären H3-Vorläufervirus mittels BLAST, phylogenetischer Stammbaum- und Sequenzanalyse

Um die Sequenz des nicht-adaptierten aviären PB1-Gensegments des unbekannten aviären H3-Vorläufervirus zu rekonstruieren, wurde zunächst mit der von Brown *et al.*, 2001 publizierten PB1-Nukleotidsequenz des pandemischen HK68 Virusisolats A/Hong Kong/1/68 (H3N2) [NCBI Zugriffsnummer AF348172] eine BLASTn-Analyse durchgeführt. Im Rahmen dieser wurden fünfhundert PB1-Sequenzen von humanen und porzinen H3N2, humanen H2N2 und aviären Virusisolaten identifiziert, welche basierend auf der PB1-Nukleotidsequenz des offenen Leserahmens die größte Homologie zu der PB1-Sequenz des pandemischen HK68-Virus aufwiesen. Um ausgehend von den in der BLASTn-Analyse identifizierten Virusisolaten, dasjenige Virus zu identifizieren, welches phylogenetisch am nächsten verwandt zu dem pandemischen HK68-Virus ist, wurden die PB1-Sequenzen, der in der BLASTn-Analyse identifizierten Virusisolate der Datenbank *National Center for Biotechnology Information Influenza Virus Ressource* entnommen, mit Hilfe des Programms Bioedit (Hall 1999) zusammengestellt und einer Stammbaum-Analyse unterzogen. Hierbei wurde beobachtet, dass die Mehrheit der identifizierten humanen und porzinen H3N2-Virusisolate die nach 1969 isoliert wurden, Nachfahren des pandemischen HK68-Virus darstellen und somit nicht zur Rekonstruktion der aviären PB1-Sequenz des aviären H3-Vorläufervirus in Betracht gezogen werden können. Daher wurden alle PB1-Sequenzen humaner und porziner H3N2 Virusisolate, die nach 1969 isoliert wurden, verworfen. Zur Erstellung des in Abb. IV.14 dargestellten phylogenetischen Stammbaums wurden die PB1-Nukleotidsequenzen folgender Virusisolate verwendet: 1.) der pandemischen H3N2 Virusisolate aus den Jahren 1968 und 1969, 2.) die zum HK68-Virus nächst-verwandten aviären Virusisolate aus Nordamerika und Australien, sowie 3.) humane H2N2-Isolate aus den Jahren 1957-1959.

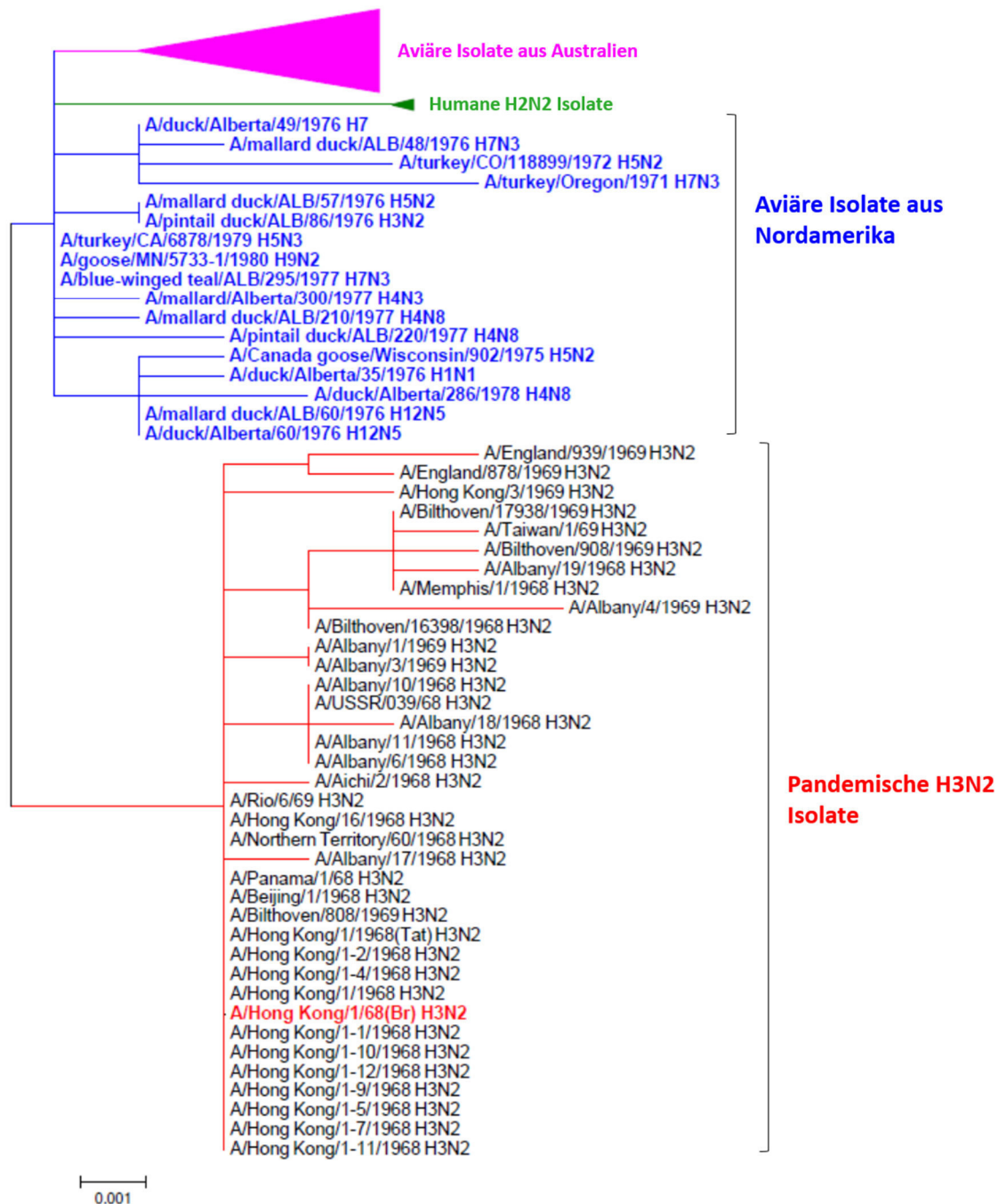
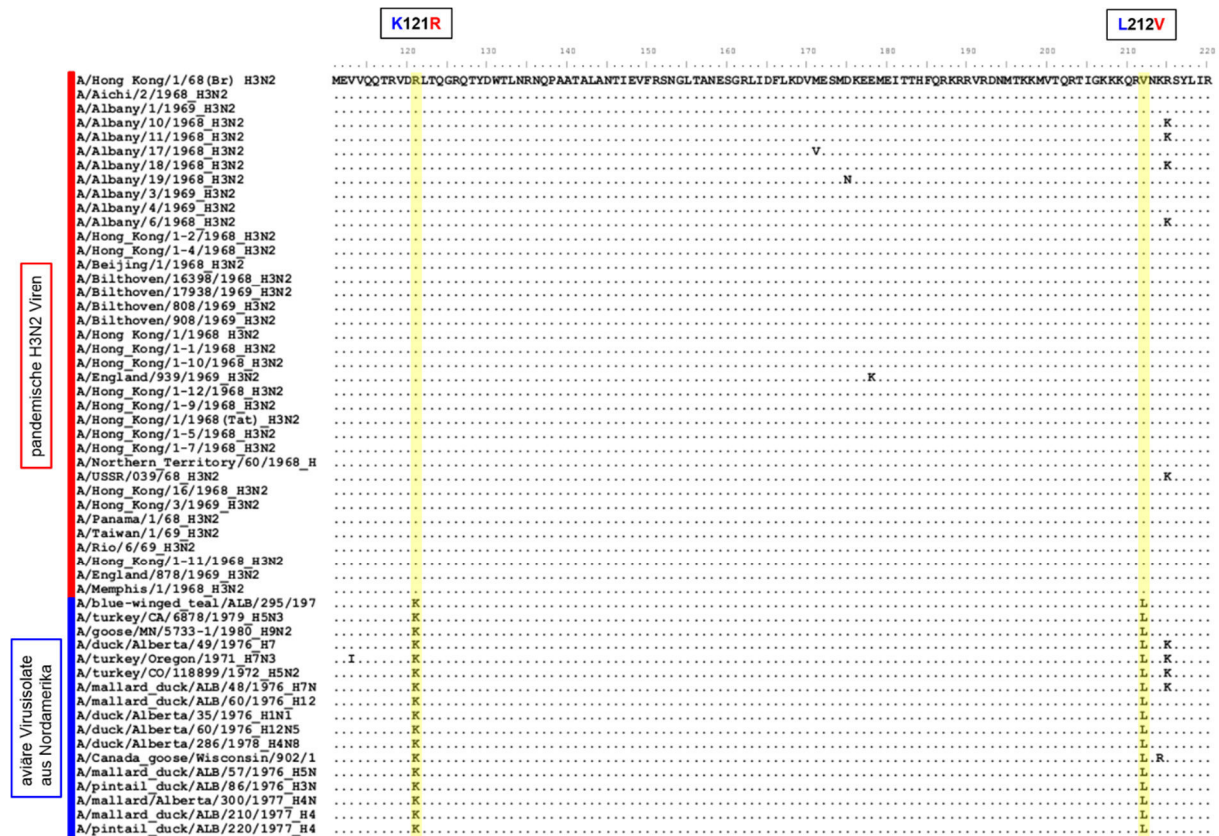


Abb. IV.14: Phylogenetischer Stammbaum für die kodierenden PB1-Nukleotidsequenzen der pandemischen H3N2-Viren aus den Jahren 1968 und 1969, humaner H2N2-Viren aus den Jahren 1957 bis 1959 und der zum pandemischen HK68-Virus nächst-verwandten aviären Virusisolate aus Nordamerika und Australien. Das pandemische A/Hong Kong/1/68 (H3N2) Virusisolat (**rot hervorgehoben**) ist am nächsten verwandt zu den aviären Isolat aus Nordamerika (**blau**), während die beiden Gruppen der aviären Virusisolate aus Australien (**pink**), sowie die humanen H2N2-Virusisolate von 1957-1959 (**grün**) entferntere Verwandte zum pandemischen HK68-Virus darstellen. Die Erstellung des Stammbaums erfolgte mit Hilfe der Mega6-Software (Tamura *et al.*, 2013) unter Verwendung der Minimal Evolution Methode.

Wie dem in Abb. IV.14 für das PB1-Gensegment dargestellten phylogenetischen Stammbaum entnommen werden kann, ist die Gruppe der in Nordamerika isolierten aviären Virusisolate am nächsten verwandt zu dem PB1-Gensegment des pandemischen HK68-Virus. Die beiden Gruppen der aviären Virusisolate aus Australien, sowie der humanen H2N2-Virusisolate stellen hingegen entferntere Verwandte dar.

Um ausgehend von dieser Erkenntnis die Sequenz des nicht-adaptierten aviären PB1-Gensegments des aviären H3-Vorläufervirus zu rekonstruieren und somit die adaptiven Mutationen zu identifizieren, welche während der Adaptation des aviären PB1-Gensegments an den Menschen aufgetreten sind, wurden die PB1-Sequenzen der aviären Virusisolate aus Nordamerika, mit denen der pandemischen H3N2-Virusisolate in einem Sequenzvergleich verglichen (Abb. IV.15).



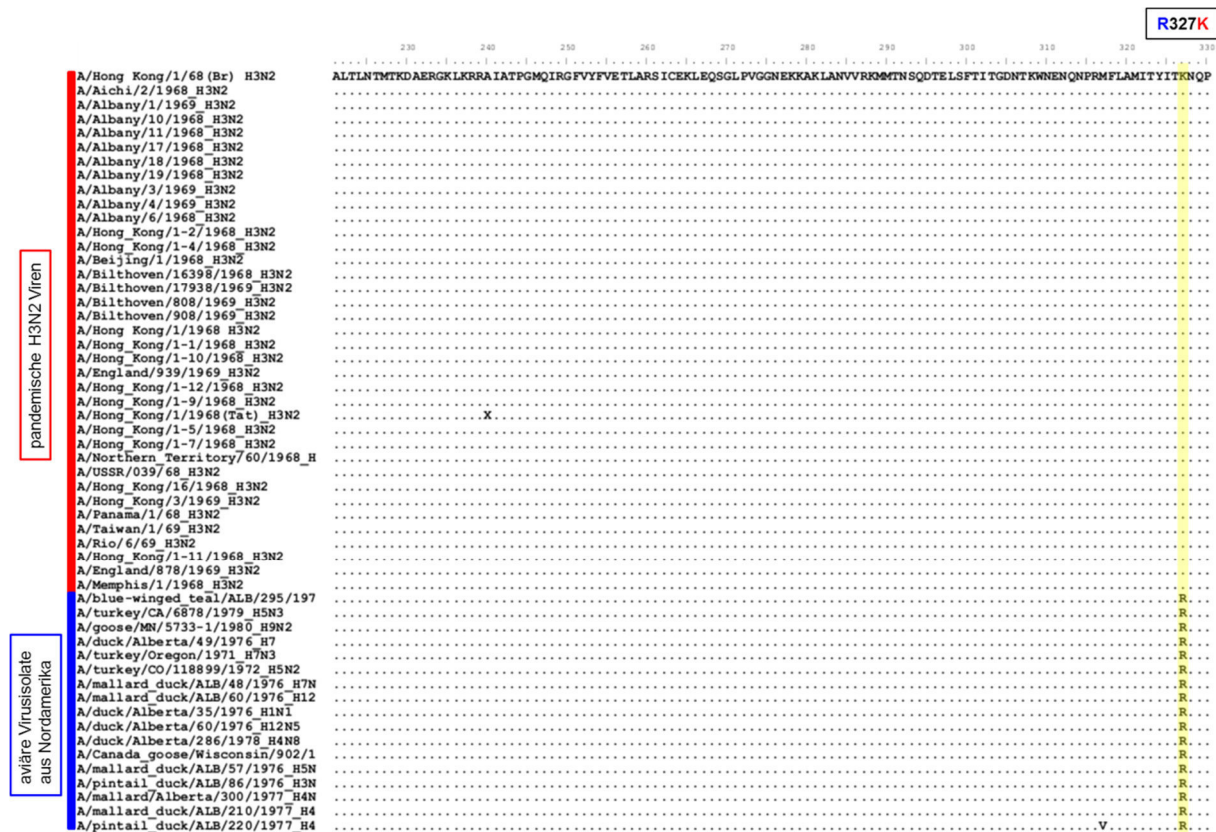


Abb. IV.15: PB1-Sequenzvergleich der pandemischen H3N2-Viren mit den aviären Virusisolaten aus Nordamerika. Um die nicht-adaptierte aviäre PB1-Sequenz des unbekannten aviären H3-Vorläufervirus zu rekonstruieren, wurden die PB1-Aminosäuresequenzen der pandemischen H3N2-Viren (**rot**) mit denen der nächstverwandten nordamerikanischen aviären Virusisolate (**blau**) verglichen. Dargestellt sind die PB1-Sequenzen von Aminosäure 111 – 330, in denen sich die Sequenzen der pandemischen H3N2-Virusisolate in Folge von Adaptation durch die drei human-adaptiven PB1-Mutationen K121R, L212V und R327K (**hellgelb**) von denen der nordamerikanischen aviären Viren unterscheiden.

Hierbei war zu beobachten, dass sich die PB1-Sequenzen der pandemischen H3N2-Viren von den aviären Virusisolaten aus Nordamerika an den drei Aminosäurepositionen PB1-121, -212 und -327 voneinander unterscheiden. Während die aviären Virusisolate ausschließlich an Position PB1-121 ein Lysin, an Position PB1-212 ein Leucin und an Position PB1-327 ein Arginin kodieren, weisen die pandemischen H3N2 Virusisolate an diesen Positionen ein Arginin (Position PB1-121), Valin (Position PB1-212) und Lysin (Position PB1-327) auf (Abb. IV.15). Um sicher zu gehen, dass es sich bei diesen Mutationen um adaptive Mutationen handelt, wurde mittels phylogenetischer Stammbaumanalyse überprüft, dass auch die entfernter verwandten Vorläuferviren der pandemischen H3N2-Viren an diesen Positionen ausschließlich die Signatur der aviären Virusisolate aus Nordamerika aufweisen. Dies ist für alle drei Positionen der Fall, wie in Abb. IV.16 A beispielhaft für Position PB1-212 dargestellt ist.

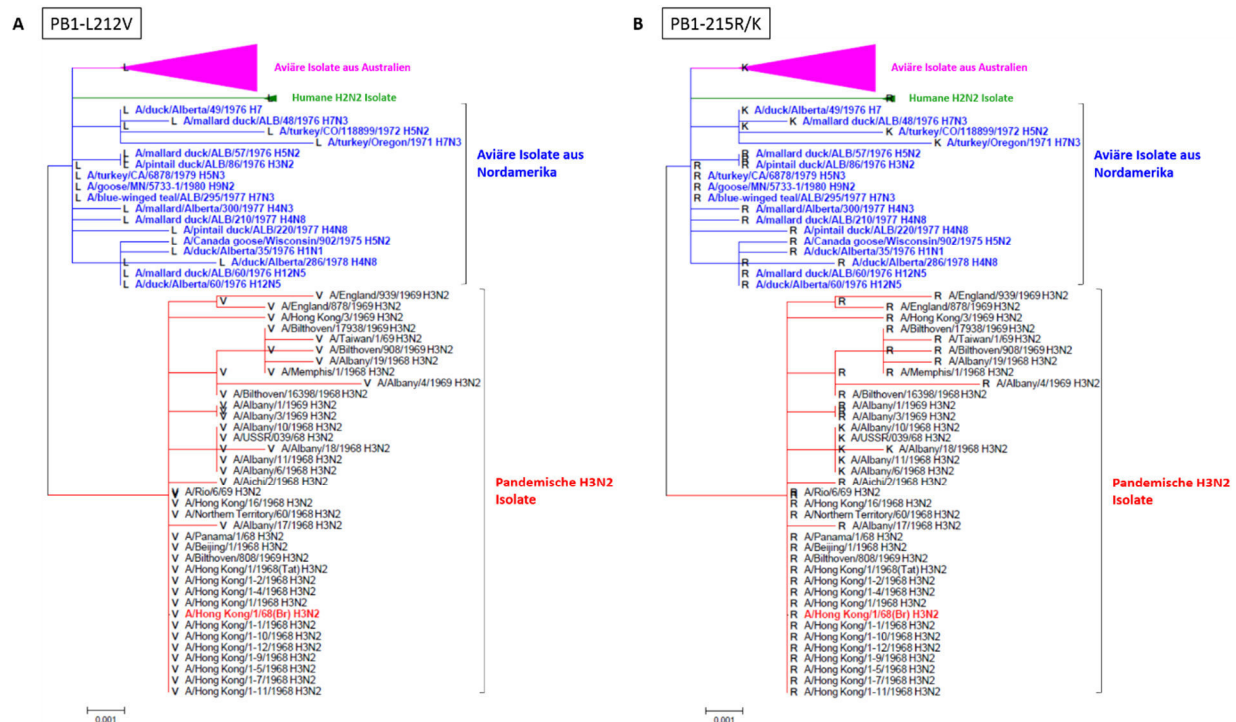


Abb. IV.16: Phylogenetischer Stammbaum für die kodierenden PB1-Nukleotidsequenzen der zu den pandemischen H3N2-Viren nächstverwandten Viren. Dargestellt sind die für die einzelnen Virusisolate spezifischen Aminosäuren an den Positionen **(A)** PB1-212 und **(B)** PB1-215. Die Erstellung des Stammbaums erfolgte mit Hilfe der Mega6-Software (Tamura *et al.*, 2013) unter Verwendung der Minimal Evolution Methode.

Neben diesen drei adaptiven Mutationen war des Weiteren an Position PB1-215 eine Heterogenität zu beobachten, die jedoch nicht wie die Positionen PB1-121, -122 und -327 eine starke Konservierung zwischen den nächstverwandten aviären Vorläuferviren und den pandemischen H3N2-Viren aufwies und daher als virusspezifische Heterogenität nicht weiter Beachtung fand (Abb. IV.15 und IV.16 B). Zudem beschrieb Taubenberger *et al.*, dass die Position 375 im PB1 möglicherweise eine wichtige Rolle als Wirtsdeterminante bei der Adaptation aviärer Polymerasen an den Menschen spielen könnte (Taubenberger *et al.*, 2005). Allerdings wird bereits in genannter Publikation beschrieben, dass diese Position ebenfalls sehr heterogen vorliegt, in dem zwar die Mehrheit der aviären PB1-Sequenzen an dieser Position ein Asparagin tragen, jedoch 18% der aviären PB1-Sequenzen genau wie die humanen PB1-Sequenzen ein Serin bzw. 12% ein Threonin kodieren.



Abb. IV.17: (A) Phylogenetischer Stammbaum und (B) Sequenzanalyse für die von Taubenberger et al., 2005 vorgeschlagene adaptive Mutation PB1-N375S. Um zu überprüfen, ob die von Taubenberger et al. vorgeschlagene adaptive Mutation PB1-N375S bei der Entstehung der Pandemie von 1968 eine Rolle spielte, wurden die für die Vorläuferviren spezifischen Aminosäuren an Position PB1-375 mit denen der pandemischen H3N2-Virus verglichen. **(A)** Phylogenetischer Stammbaum für die zu den pandemischen H3N2-Viren nächstverwandten Viren. Dargestellt sind die für die einzelnen Virusisolate spezifischen Aminosäuren an der Position PB1-375. Die Erstellung des Stammbaums erfolgte mit Hilfe der Mega6-Software (Tamura et al., 2013) unter Verwendung der Minimal Evolution Methode. **(B)** PB1-Sequenzvergleich der pandemischen H3N2-Viren (**rot**) mit denen der aviären Virusisolate aus Nordamerika (**blau**). Dargestellt sind die PB1-Sequenzen von Aminosäure 331 – 400. An Aminosäure-Position PB1-375 kodieren sowohl die pandemischen H3N2 Viren, als auch die aviären Virusisolate aus Nordamerika für ein Serin (**hellgelb unterlegt**).

Eine genauere Betrachtung der Position PB1-375 in dieser Arbeit zeigte (Abb. IV.17), dass sowohl die nächstverwandten aviären Vorläuferviren, als auch die pandemischen H3N2-Viren an dieser Position für ein Serin kodieren. Dementsprechend kann diese Position bei der Adaptation des aviären PB1-Gens des aviären H3-Vorläufervirus an den Menschen keine Rolle gespielt haben.

Zusammenfassend konnten somit in dieser Arbeit die Mutationen PB1-K121R, -L212V und -R327K als human-adaptive Mutationen identifiziert werden, in denen sich die pandemischen HK68-Viren von dem unbekannten aviären H3-Vorläufervirus unterscheiden (Tab. IV.4).

Tab. IV.4: Human-adaptive Mutationen des PB1-Proteins, in denen sich die aviären PB1-Proteine der pandemischen H3N2-Isolate von denen der nächst-verwandten aviären Virusisolate unterscheiden. Die für das nicht-adaptierte aviäre PB1 spezifischen Aminosäuren sind in **blau** und die für die pandemischen H3N2-Viren spezifischen Aminosäuren sind in **rot** dargestellt.

Isolate	Aminosäure-Position im PB1		
	121	212	327
aviäre Isolate aus Nordamerika	K	L	R
pandemische H3N2 Isolate (1968 – 1969)	R	V	K

IV.6.2 Generierung nicht-adaptierter aviärer PB1-Plasmide

Nachdem die adaptiven Mutationen im aviären PB1-Protein des pandemischen HK68-Virus identifiziert wurden, sollte untersucht werden ob das nicht-adaptierte aviäre PB1 des aviären H3-Vorläufervirus dem pandemischen HK68-Virus ebenfalls einen replikativen Vorteil hätte unterbreiten können. Zu diesem Zweck wurde ausgehend von dem Plasmid pHW-PB1_{HK} mittels zielgerichteter Mutagenese (III.1.14) das Plasmid pHW-PB1_{HK-121/212/327} generiert, das an den Aminosäure-Positionen PB1-121, -212 und -327 die Aminosäure-Signatur der aviären Vorläuferviren aufweist und somit die Aminosäure-Sequenz des nicht-adaptierten aviären PB1 kodiert (Tab. IV.5).

Tab. IV.5: Darstellung der Aminosäure-Substitutionen zwischen den PB1-Plasmiden, die für das human-adaptierte aviäre PB1 des pandemischen HK68-Virus (pHW-PB1_{HK}; rot) und das nicht-adaptierte aviäre PB1 des aviären H3-Vorläufervirus (pHW-PB1_{HK-121/212/327}; blau) kodieren.

Konstrukt	Aminosäure-Position im PB1		
	121	212	327
pHW-PB1 _{HK}	R	V	K
pHW-PB1 _{HK-121/212/327}	K	L	R

IV.6.3 Einfluss des nicht-adaptierten aviären PB1-Gens auf die virale Replikationseffizienz

Nachdem das nicht-adaptierte aviäre PB1-Gen mit Hilfe von phylogenetischen Studien und Sequenzanalysen rekonstruiert werden konnte, sollte dessen Einfluss auf die virale Replikationseffizienz untersucht werden. Da neben dem Adaptationsgrad des an der Reassortierung beteiligten aviären PB1-Gens ebenfalls unbekannt ist, in welcher Wirtsspezies die Reassortierung des pandemischen HK68-Virus stattfand (Abb. IV.13) und ob die bestehenden Unterschiede in der Körpertemperatur der verschiedenen Wirtsspezies einen Einfluss auf die Reassortierung haben, sollten in den nachfolgend beschriebenen kompetitiven Rescue-Experimenten folgende zwei Fragestellungen untersucht werden:

- 1.) Hätte ein nicht-adaptiertes aviäres PB1-Gensegment dem pandemischen HK68-Virus ebenfalls einen replikativen Vorteil unterbreitet?
- 2.) Kann das aviäre PB1-Gensegment (nicht-adaptiert/human-adaptiert) ebenfalls bei einer Körpertemperatur von 33°C, welche im oberen Respirationstrakt des Menschen vorherrscht, einen replikativen Vorteil unterbreiten?

Um diese beiden Fragestellungen untersuchen zu können, wurden die PB1-Plasmide welche entweder für das nicht-adaptierte aviäre PB1 des aviären H3-Vorläufervirus (PB1_{HK-121/212/327}) oder für das human-adaptierte aviäre PB1 des pandemische HK68-Virus (PB1_{HK}) kodieren zusammen mit den humanen PB1-Plasmiden des humanen Vorläufervirus Cal66, die entweder ein Adenin (PB1_{Cal}-A4) oder Guanin (PB1_{Cal}-G4) an Position 4 im 3'NCR aufweisen, im Verhältnis 1:1 in 293T-Zellen transfiziert. Abhängig von dem zu untersuchenden Viruspaar wurden zudem entweder das HA-Plasmid, welches für das humane HA des Cal66-Virus (PB1-Paar) oder das aviäre HA des HK68-Virus (HA+PB1-Paar) kodiert, sowie sechs Plasmide, welche für die restlichen Gensegmente des Cal66-Virus kodieren, kotransfiziert. Anschließend wurde wie bereits in Abschnitt III.3.8 beschrieben fortgefahren und die genotypische Zusammensetzung der erhaltenen kompetitiv hergestellten Virusmischungen mittels Sequenzierung des PB1-Gens bestimmt (IV.3.2).

Um untersuchen zu können, ob das aviäre PB1 bei Reassortierung im oberen Respirationstrakt des Menschen (33°C) ebenfalls einen replikativen Vorteil hätte unterbreiten können, wurde dieses Experiment im Gegensatz zu den vorangegangenen Experimenten bei einer Temperatur von 33°C inkubiert.

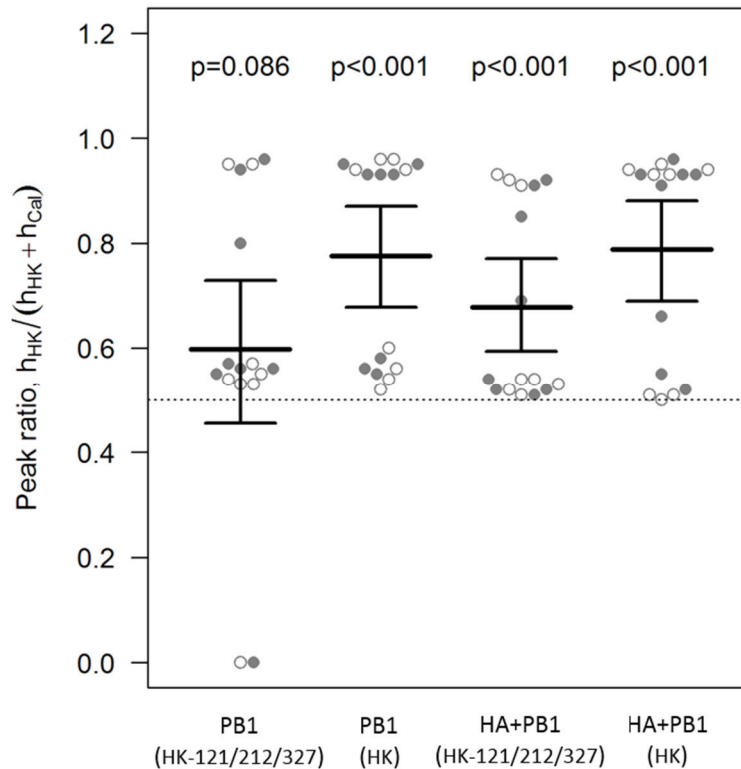


Abb. IV.18: Kompetitive Rescue-Experimente in Calu-3-Zellen zur Evaluierung des Einflusses des nicht-adaptierten aviären PB1-Gensegments PB1_{HK-121/212/327} auf die virale Replikationseffizienz. Die kompetitiven Rescue-Experimente wurden bei einer Temperatur von 33°C und mit einer 1:1 Mischung der PB1-Plasmide PB1_{Cal} und entweder PB1_{HK} [**PB1 (HK)** und **HA+PB1 (HK)**] oder PB1_{HK-121/212/327} [**PB1 (HK-121/212/327)** und **HA+PB1 (HK-121/212/327)**] wie in der Legende zu Abb. IV.8 beschrieben, durchgeführt. Da für Mutation G4 erneut kein Einfluss auf die virale Replikationseffizienz nachgewiesen werden konnte, werden die ermittelten mittleren Verhältnisse der Peak-Höhe für PB1_{HK} für die kompetitiven Rescues mit PB1_{Cal}-Plasmiden, welche ein G4 bzw. ein A4 im 3'NCR kodieren, als kombinierte Daten in Form von **offenen** (G4) bzw. **gefüllten Kreisen** (A4) dargestellt. Die gepunktete Linie stellt das mittlere Verhältnis der Peak-Höhe für PB1_{HK} bzw. PB1_{HK-121/212/327} dar, das zu erwarten ist, wenn beide Viren gleich effizient replizieren. Die mittlere Differenz beträgt zwischen PB1 (HK-121/212/327) und HA+PB1 (HK-121/212/327): 0,08 (-0,08...0,25), p=0,336 und zwischen PB1 (HK) und HA+PB1 (HK): 0,01 (-0,12...0,14), p=0,856. Die Rohdaten des Experiments sind im Anhang dieser Arbeit aufgeführt.

Im Rahmen dieser Experimente konnte erneut für das human-adaptierte PB1_{HK}-Gen des pandemischen HK68-Virus gezeigt werden, dass dieses unabhängig vom Ursprung des HA-Gens die virale Replikationseffizienz erhöht (Abb. IV.18; PB1 (HK) und HA+PB1 (HK)). Zudem konnte im Vergleich zu den vorangegangenen kompetitiven Rescue-Experimenten (IV.3.2 und IV.5.2) beobachtet werden, dass die Erhöhung der viralen Replikationseffizienz durch das human-adaptierte PB1_{HK}-Gen unabhängig von der Körpertemperatur der Wirtsspezies erfolgt. Für das nicht-adaptierte aviäre PB1_{HK-121/212/327} des aviären H3-Vorläufervirus wurde hingegen beobachtet, dass dieses zumindest in Gegenwart des homologen HA_{HK}-Gensegments die virale

Replikationseffizienz signifikant erhöht (Abb. IV.18; HA+PB1 (HK-121/212/327)). In Abwesenheit des homologen HA_{HK}-Gensegments erhöhte dieses die virale Replikationseffizienz jedoch nicht signifikant (Abb. IV.18; PB1 (HK-121/212/327)).

Da im Rahmen dieses Experiments somit keine Aussage darüber getroffen werden konnte, ob auch das nicht-adaptierte aviäre PB1-Gensegment des aviären H3-Vorläufervirus, die virale Replikationseffizienz unabhängig vom Ursprung des HA-Gensegments erhöht, wurden die für das PB1-Paar erhaltenen Virusmischungen (Abb. IV.18; PB1 (HK-121/212/327) und PB1 (HK)) über drei Passagen auf Calu-3-Zellen passagiert. Hierfür wurden die Virusmischungen auf eine Konzentration von 10.000 IP/ml in Infektionsmedium verdünnt und anschließend wie in Abschnitt III.3.9 für die Koinfektions-Experimente beschrieben, fortgefahren. Die genotypische Zusammensetzung der nach drei Passagen erhaltenen Virusmischungen wurde mittels Sequenzierung des PB1-Gens bestimmt (IV.3.2).

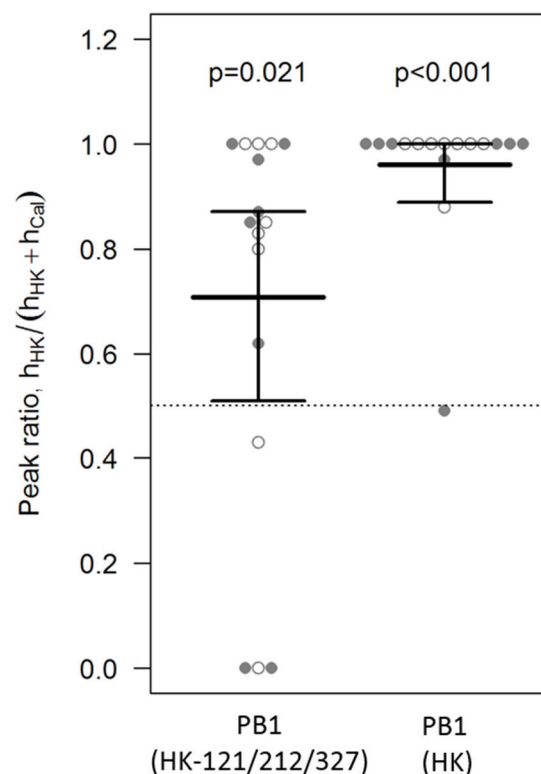


Abb. IV.19: Zusammensetzung der nach drei Passagen auf Calu-3-Zellen erhaltenen kompetitiv hergestellten Virusmischungen des PB1-Paares. Die Rohdaten des Experiments sind im Anhang dieser Arbeit aufgeführt.

Nach drei Passagen auf Calu-3-Zellen war zu beobachten, dass neben dem human-adaptierten aviären PB1_{HK}, ebenfalls das nicht-adaptierte aviäre PB1_{HK-121/212/327} den neu reassortierten Viren einen replikativen Vorteil unterbreiten kann (Abb. IV.19; PB1 (HK-121/212/327)). Des Weiteren wurde weder in den kompetitiv hergestellten Virusmischungen (Abb. IV.18), noch in den anschließend passagierten Virusmischungen (Abb. IV.19) ein Einfluss der Mutation G4 im PB1_{Cal}-Gensegment auf die virale Replikationseffizienz nachgewiesen.

Zusammenfassend konnte somit gezeigt werden, dass das nicht-adaptierte aviäre PB1-Gen, als auch das human-adaptierte aviäre PB1-Gen unabhängig vom Ursprung des HA-Gens und der Körpertemperatur der Wirtsspezies die virale Replikationseffizienz des pandemischen HK68-Virus erhöht haben könnten. Für Mutation G4 wurde im Rahmen dieser Experimente bestätigt, dass diese keinen signifikanten Einfluss auf die virale Replikationseffizienz nimmt.

IV.7 Einfluss des aviären PB1-Gens auf die Aktivität rekonstituierter viraler Ribonukleoproteinkomplexe

Die PB1-Untereinheit des viralen Ribonukleoproteinkomplex (vRNP) besitzt die katalytische Aktivität einer RNA-abhängigen RNA-Polymerase und ist somit für die RNA-Synthese während der viralen Replikation und Transkription verantwortlich (I.4.2). Um zu überprüfen, ob das aviäre PB1 die beobachtete, gesteigerte Replikations- und Übertragungseffizienz der rCal66-Viren (IV.3, IV.4 und IV.6.3) in Folge einer erhöhten Polymerase-Aktivität vermittelt, wurde die Polymerase-Aktivität von rekonstituierten vRNP-Komplexen mit aviärem oder humanem PB1 mit Hilfe von Luziferase-Minigenom Assays bestimmt (III.1.16).

IV.7.1 Polymerase-Aktivitäten des humanen Vorläufervirus A/California/1/66 und des pandemischen A/Hong Kong/1/68-Virus in 293T-Zellen

Für die Luziferase-Minigenom Assays wurden die Plasmide, welche für die vRNP's von Cal66 bzw. HK68 kodieren, zusammen mit den Reporterplasmiden des Influenza-Minigenoms pPol I-NP-luc und pGL4.73 [hRluc/SV40] in 293T-Zellen kotransfiziert (III.1.16.1). 24 h nach Transfektion wurde die Polymerase-Aktivität der rekonstituierten vRNPs durch Messung der Firefly-Luziferase-Aktivität bestimmt (III.1.16.2). Um den Einfluss des aviären PB1-Proteins auf

die virale Polymerase-Aktivität untersuchen zu können, wurden zudem rekonstituierte vRNP-Komplexe transfiziert, in welchen das humane PB1 gegen das aviäre PB1 ausgetauscht wurde und umgekehrt. Zur Standardisierung der Firefly-Luziferase-Aktivität, wurde zusätzlich die Renilla-Luziferase-Aktivität gemessen.

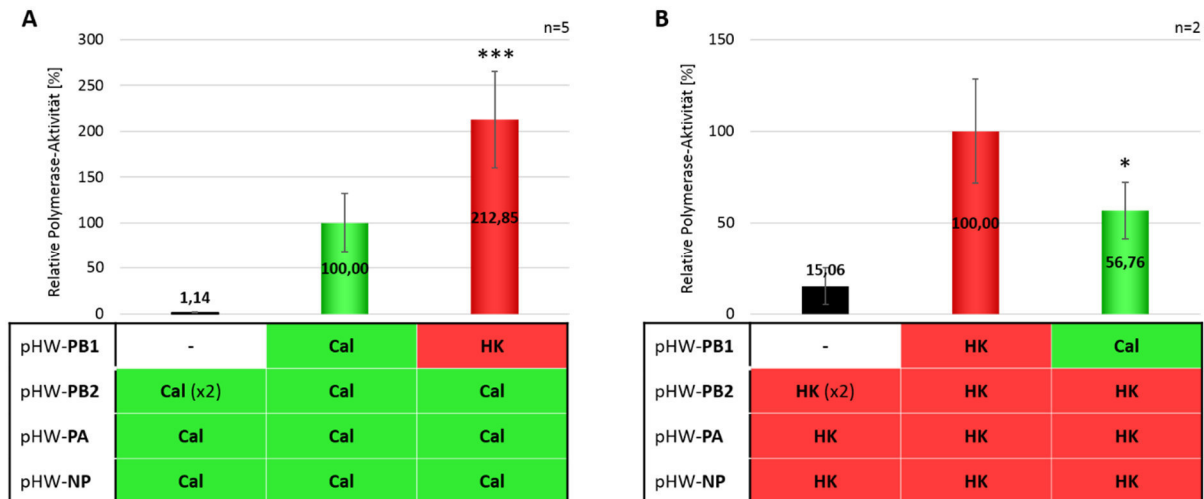


Abb. IV.20: Polymerase-Aktivitäten der rekonstituierten vRNP's von (A) Cal66 und (B) HK68. Dargestellt ist je vRNP-Komplex der Mittelwert der relativen Polymerase-Aktivität in Prozent, welcher sich aus (A) fünf bzw. (B) zwei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten ergibt. Statistisch signifikante Unterschiede wurden mit Hilfe des Student's-t-Test ermittelt (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Das human-adaptierte aviäre PB1_{HK} erhöht die Polymerase-Aktivität des Cal66-vRNP-Komplex zweifach (Abb. IV.20 A). Umgekehrt resultiert der Austausch des human-adaptierten aviären PB1_{HK} gegen das humane PB1_{Cal} in einer zweifachen Reduktion der Polymerase-Aktivität des HK68-vRNP-Komplexes (Abb. IV.20 B). Somit konnte in diesen Experimenten gezeigt werden, dass das aviäre PB1 des pandemischen HK68-Virus die Polymerase-Aktivität humaner vRNP-Komplexe zweifach erhöhen kann.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die erhöhte Polymerase-Aktivität des PB1_{HK} mit zu der beobachteten erhöhten Replikations- und Übertragungseffizienz der Cal66-Viren beigetragen und somit eine wesentliche Rolle bei der Entstehung des pandemischen HK68-Virus gespielt haben könnte.

IV.7.2 Einfluss des nicht-adaptierten aviären PB1-Gens auf die Polymerase-Aktivität des humanen Vorläufervirus A/California/1/66

Um als nächstes zu untersuchen, ob die Polymerase-Aktivität des nicht-adaptierten aviären PB1 ebenfalls mit der in Abschnitt IV.6.3. beobachteten erhöhten Replikationseffizienz der rCal-Viren korreliert, wurden Luziferase-Minigenom Assays mit dem nicht-adaptierten aviären PB1_{HK-121/212/327} (IV.6.2) im Hintergrund des Cal66-vRNP-Komplex durchgeführt (Abb. IV.21).

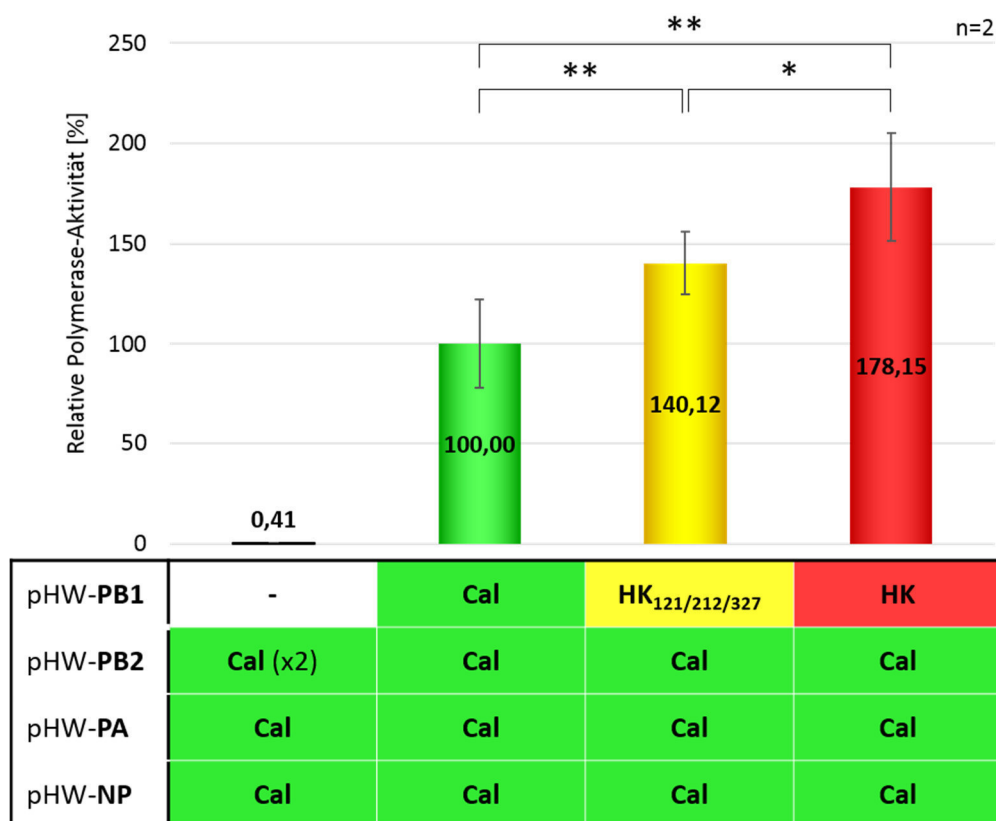


Abb. IV.21: Polymerase-Aktivität rekonstituierter Cal66-vRNP-Komplexe mit nicht-adaptiertem aviärem PB1_{HK-121/212/327}. Dargestellt ist je vRNP-Komplex der Mittelwert der relativen Polymerase-Aktivität in Prozent, welcher sich aus zwei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten ergibt. Die statistische Signifikanz wurde mit Hilfe des Student's-t-Test bestimmt (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Für das nicht-adaptierte aviäre PB1_{HK-121/212/327} wurde beobachtet, dass dieses im Vergleich zum humanen PB1_{Cal} die Polymerase-Aktivität des Cal66-vRNP-Komplex 1,5-fach erhöht und somit eine intermediäre Polymerase-Aktivität zum humanen PB1_{Cal} und human-adaptierten aviären PB1_{HK} aufweist (Abb. IV.21).

Diese Daten deuten darauf hin, dass das nicht-adaptierte aviäre PB1_{HK-121/212/327} ebenfalls auf Grund einer erhöhten Polymerase-Aktivität dem pandemischen HK68-Virus einen replikativen

Vorteil unterbreitet und somit zur Entstehung der Pandemie beigetragen haben könnte. Des Weiteren weisen diese Daten darauf hin, dass während der Adaptation des aviären PB1 an humane Zellen die Polymerase-Aktivität optimiert wurde, welche im Vergleich zum nicht-adaptierten aviären PB1_{HK-121/212/327} in einer weiteren 0,5-fachen Erhöhung der Polymerase-Aktivität resultierte.

IV.8 Die Adaptation des aviären PB1-Gens an den Menschen und ihr Einfluss auf die Polymerase-Genauigkeit

Ein weiterer Mechanismus, der neben einer Erhöhung der viralen Replikationseffizienz in Folge einer erhöhten viralen Polymerase-Aktivität mit zu der Entstehung des pandemischen HK68-Virus beigetragen haben könnte, besteht in der Polymerase-Genauigkeit mit der die virale Polymerase das virale Genom repliziert.

Bereits 1993 hat diesbezüglich Scholtissek *et al.* postuliert, dass eine herabgesetzte Polymerase-Genauigkeit, welche in einer breiten Quasispezies-Diversität resultiert, notwendig ist, um einem neu in Säugetiere eingebrachten aviären Influenza-Virus die Adaptation an eine neue Wirtsspezies und somit die Ausbildung einer neuen Viruslinie zu ermöglichen (Scholtissek *et al.*, 1993). Diesbezüglich konnte in verschiedenen Studien sowohl für die aviär-ähnlichen Schweineviren, als auch für den im Menschen zirkulierenden Virusstamm A/Fujian/411/2002 (H3N2) gezeigt werden, dass beide Viren aufgrund kurzzeitig reduzierter Polymerase-Genauigkeiten eine breitere Quasispezies-Diversität ausbilden und sich in Folge dessen effizient an die neue Wirtsspezies adaptieren konnten (Ludwig *et al.*, 1995; Wong *et al.*, 2011).

Da breite Quasispezies-Diversitäten das Überwinden von Wirtsbarrieren erleichtern und eine Selektion der an die neue Wirtsspezies am besten angepassten Viren ermöglichen, wäre es denkbar, dass kurzzeitig herabgesetzte Polymerase-Genauigkeiten mit zu der Entstehung pandemischer Influenza-Viren beitragen.

Daher sollte im zweiten Teil dieser Arbeit, anhand der Entstehung der Pandemie von 1968, der Einfluss des aviären PB1 auf die virale Polymerase-Genauigkeit untersucht werden.

IV.8.1 Einfluss des aviären PB1-Gens auf die virale Polymerase-Genauigkeit

Zunächst wurde untersucht, ob durch das Einbringen des aviären PB1 in den Polymerasekomplex des humanen H2N2 Ersatzvorläufervirus A/California/1/66 (H2N2) die Polymerase-Genauigkeit der initialen Reassortante zeitweilig reduziert wurde. Dies könnte in einer breiteren Quasispezies-Diversität resultiert haben, welche die Adaptation der Reassortante an den Menschen erleichtert und somit zu der Entstehung des pandemischen HK68-Virus beigetragen haben könnte. Hierfür wurde in Kooperation mit Herrn Dr. Marco Vignuzzi und Herrn Dr. Kenneth Stapleford (Institut Pasteur, Paris) die Mutationsrate rekombinanter HK68-Viren bestimmt, welche entweder das humane PB1_{Cal} des humanen Ersatzvorläufervirus (rHK-PB1_{Cal}), das nicht-adaptierte aviäre PB1_{HK-121/212/327} des unbekannten aviären Vorläufervirus (rHK-PB1_{HK-121/212/327}) oder das human-adaptierte aviäre PB1_{HK} des pandemischen HK68-Virus (rHK68) tragen.

Virus	Anzahl der...			
	ermittelten Mutationen	sequenzierten Sequenzen	sequenzierten Nukleotide	Mutationen/ 10k Nukleotiden
rHK-PB1 _{Cal}	149	287	197440	7,55
rHK-PB1 _{HK-121/212/327}	184	307	207070	8,89
rHK68	141	322	217960	6,47

Tab. IV.6: Mutationsrate rekombinanter HK68-Viren mit humanem PB1_{Cal} (rHK-PB1_{Cal}), nicht-adaptiertem aviärem PB1_{HK-121/212/327} (rHK-PB1_{HK-121/212/327}) und human-adaptiertem aviärem PB1_{HK} (rHK68). Die Tabelle gibt die Mutationsrate des NS-Gensegments rekombinanter HK68-Viren wieder. Diese ist als Anzahl der mittels Sanger-Sequenzierung bestimmten Mutationen je 10k Nukleotiden angegeben und ergibt aus der Division der Anzahl der ermittelten Mutationen durch die Anzahl der sequenzierten Nukleotide multipliziert mit dem Faktor 10.000.

Durch Sanger-Sequenzierung mehrerer DNA-Klone des NS-Gensegments und anschließender Bestimmung der Mutationen pro 10k Nukleotiden konnte beobachtet werden, dass rekombinante HK68-Viren mit nicht-adaptiertem aviärem PB1_{HK-121/212/327}, wie in der initialen Reassortante der Fall, mit 8,89 Mutationen/10k Nukleotiden die höchste Mutationsrate aufwiesen (Tab. IV.6). Im Vergleich dazu wiesen die Viren mit humanem PB1_{Cal} mit 7,55 Mutationen/10k Nukleotiden eine mittlere und die dem pandemischen HK68-Virus homologen Viren mit human-adaptierten aviärem PB1_{HK} mit 6,47 Mutationen/10k Nukleotiden die geringste Mutationsrate auf.

Unter der Voraussetzung, dass an der Reassortierung des pandemischen HK68-Virus das nicht-adaptierte aviäre PB1_{HK-121/212/327} beteiligt war, deuten diese Daten darauf hin, dass durch das Einbringen des nicht-adaptierten aviären PB1 in den humanen Polymerasekomplex des humanen H2N2 Voräufervirus, dessen Polymerase-Genauigkeit zeitweilig herabgesetzt wurde. Dies könnte in einer größeren Quasispezies-Diversität innerhalb der Viruspopulation und somit in einer schnelleren Adaptation der initialen Reassortante an den Menschen resultiert haben. Die Beobachtung, dass die rekombinanten HK68-Viren die geringste Polymerase-Genauigkeit aufwiesen, weist zudem daraufhin, dass während der Adaptation der initialen Reassortante an den Menschen adaptive Mutationen im PB1-Gensegment aufgetreten sind, welche die Polymerase-Genauigkeit erhöht und somit zur Etablierung der am besten an den Menschen adaptierten Viren beigetragen haben.

IV.8.2 Einfluss einzelner adaptiver Mutationen des aviären PB1-Gens auf die virale Polymerase-Genauigkeit

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die während der Adaptation des aviären PB1 an den Menschen aufgetretenen Mutationen, nicht nur die Polymerase-Aktivität optimiert (IV.7.2), sondern zudem die Polymerase-Genauigkeit erhöht haben könnten (IV.8.1), sollte untersucht werden, welche der drei in Abschnitt IV.6.1 identifizierten human-adaptiven Mutationen für die beobachtete Erhöhung der Polymerase-Genauigkeit verantwortlich sind.

Zu diesem Zweck wurden mittels reverser Genetik rekombinante HK68-Einzelmutanten generiert, in welchen jeweils eine der drei adaptiven Mutationen des PB1_{HK} zurück zur aviären Konsensussequenz mutiert wurde. Die entsprechenden PB1-Genotypen der generierten rekombinanten HK68-Einzelmutanten rHK-PB1_{HK-R121K}, rHK-PB1_{HK-V212L} und rHK-PB1_{HK-K327R} sind in Abb. IV.22 dargestellt. Die Mutations-Frequenz der Einzelmutanten wurde mittels "Deep Sequencing" (III.1.17) ermittelt und mit der des rekombinanten HK68-Virus (rHK68), sowie der initialen Reassortante (rHK-PB1_{HK-121/212/327}) verglichen (Abb. IV.22).

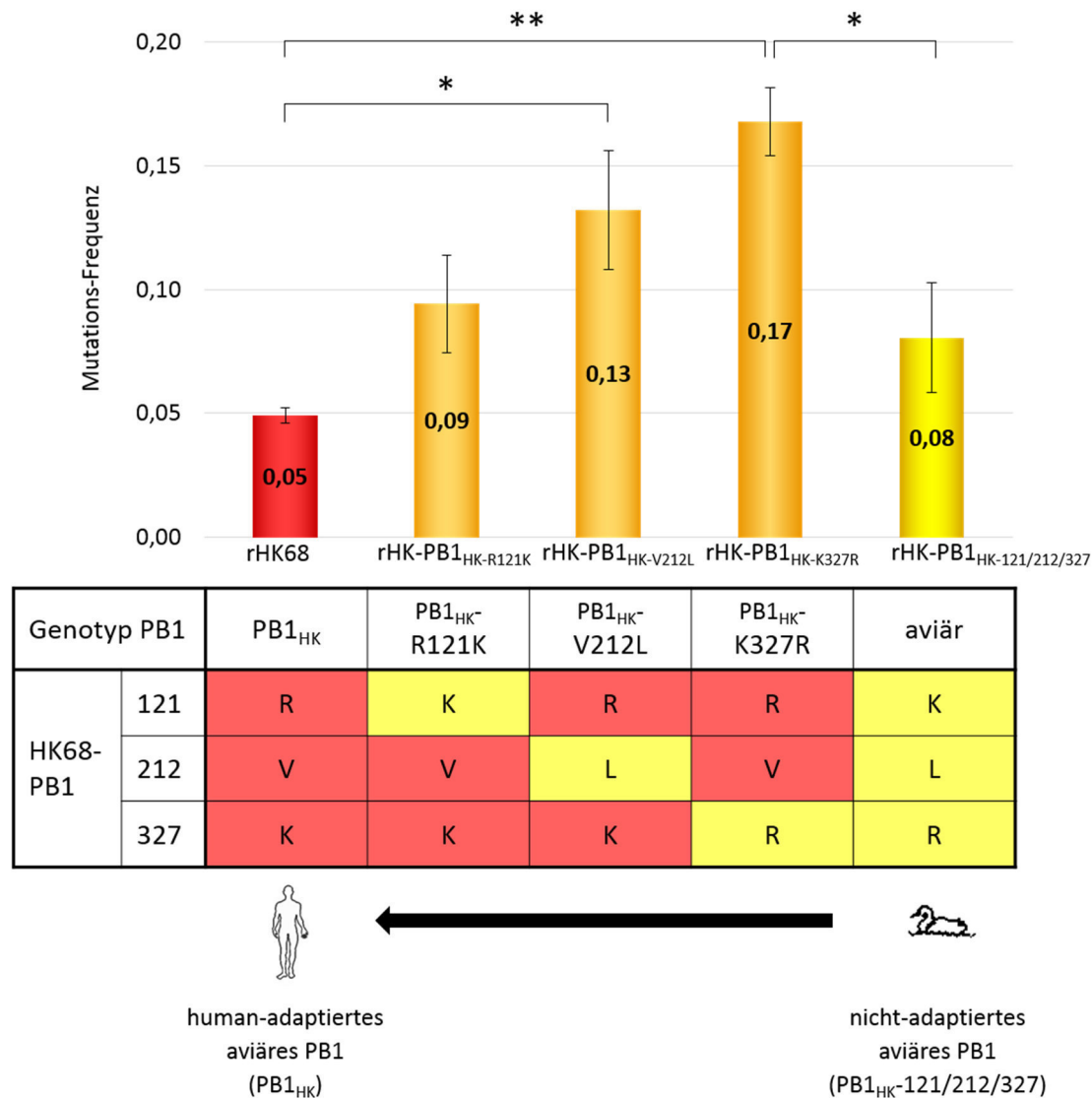


Abb. IV.22: Vergleich der Mutations-Frequenzen der rHK68-Einzelmutanten (rHK-PB1_{HK-R121K}, rHK-PB1_{HK-V212L}, rHK-PB1_{HK-K327R}) mit dem pandemischen HK68-Virus (rHK68), sowie der initialen Reassortante (rHK-PB1_{HK-121/212/327}). Dargestellt sind die Mittelwerte der mittels *Deep Sequencing* bestimmten Mutations-Frequenzen zweier unabhängig voneinander hergestellter Viruspopulationen. Die statistische Signifikanz wurde mit Hilfe des Student's-t-Test bestimmt (* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001).

Hierbei konnte beobachtet werden, dass die Kombinationen der adaptiven Mutationen PB1-K121R und -R327K, sowie PB1-K121R und -L212V die Polymerase-Genauigkeit der Reassortante reduzieren. Im Vergleich dazu wies das rHK68-Virus mit human-adaptiertem aviärem PB1 eine deutlich erhöhte Polymerase-Genauigkeit auf, welche wie bereits in Tab. IV.6 beobachtet, die der initialen Reassortante mit nicht-adaptiertem aviärem PB1 übersteigt (Abb. IV.22).

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass durch das Einbringen des aviären PB1 in den humanen Polymerasekomplex des humanen H2N2-Vorläufervirus dessen Polymerase-Genauigkeit kurzzeitig reduziert wurde. Verantwortlich für diesen Effekt könnte entweder eine Kombination der adaptiven Mutationen PB1-K121R und -R327K, sowie PB1-K121R und -L212V oder lediglich Mutation PB1-K121R sein. Obwohl unbekannt ist, welchen Adaptationsgrad das aviäre PB1 bei Reassortierung aufgewiesen hat und in welcher chronologischen Reihenfolge die adaptiven Mutationen des pandemischen PB1_{HK} aufgetreten sind, ist anzunehmen dass entweder eine Kombination der adaptiven Mutationen oder die adaptiven Mutationen PB1-L212V bzw. PB1-R327K alleine, die hohe Polymerase-Genauigkeit des pandemischen HK68-Virus wiederhergestellt haben.

Mit Hilfe der in dieser Arbeit erzielten Daten konnte erstmals gezeigt werden, dass neben einer erhöhten Polymerase-Aktivität, möglicherweise ebenfalls eine reduzierte Polymerase-Genauigkeit mit zu der Entstehung des pandemischen HK68-Virus beigetragen haben könnte.

V. Diskussion

In den letzten 500 Jahren ist es in unregelmäßigen Abständen zu mindestens 14 Influenza-Pandemien gekommen, von denen lediglich die letzten vier Pandemien wissenschaftlich gut erfasst sind (Morens *et al.*, 2010; Morens & Taubenberger, 2011). Die für die letzten vier pandemischen Influenza-Viren verfügbaren genetischen Daten deuten darauf hin, dass diese allesamt ein Hämagglutinin (HA) tierischen Ursprungs trugen (Taubenberger & Kash, 2010). Für das HA ist seit langem bekannt, dass Veränderungen in dessen immunogenen Eigenschaften (*Antigen shift*) wichtige Voraussetzungen für die Entstehung pandemischer Influenza-Viren darstellen, die es dem Virus ermöglichen der menschlichen Immunantwort zu entgehen. Des Weiteren konnte in Transmissions-Studien gezeigt werden, dass Veränderungen in der Rezeptorspezifität und der Oberflächenglykosylierung, sowie eine dem Wirt angepasste HA-Stabilität essentiell für eine effiziente Übertragbarkeit sind und mit zur pandemischen Ausbreitung der Viren beitragen (Van Hoeven *et al.*, 2009; Imai *et al.*, 2012; Herfst *et al.*, 2012).

Im Gegensatz zum HA-Gensegment variiert der Ursprung der übrigen sieben Gensegmente in den pandemischen Viren des 20./21. Jahrhunderts (Morens *et al.*, 2009; Smith *et al.*, 2009). Jedoch konnte für die pandemischen Viren von 1957 und 1968, welche beide durch Reassortierung entstanden sind, gezeigt werden, dass beide Viren interessanterweise neben einem aviären HA-, ebenfalls ein PB1-Gensegment aviären Ursprungs aufweisen (Kawaoka *et al.*, 1989). Dieses kodiert für das PB1-Protein, sowie für die beiden nicht-essentiellen viralen Proteine PB1-F2 und PB1-N40, die beide Einfluss auf die virale Replikationseffizienz und Pathogenität nehmen können (Wise *et al.*, 2009; Mazur *et al.*, 2008; McAuley *et al.*, 2010b; Chakrabarti & Pasricha, 2013). Das PB1-Protein seinerseits stellt die Hauptuntereinheit des viralen heterotrimeren RNA-abhängigen RNA-Polymerasekomplexes dar und ist sowohl für die virale Replikation, als auch für die Transkription des viralen Genoms verantwortlich (Poch *et al.*, 1989; Biswas & Nayak, 1994).

Im Allgemeinen ist bekannt, dass tierische Influenza-Viren sehr ineffizient in humanen Zellen replizieren und dass bei der Reassortierung erworbene human-adaptierte Gensegmente, entstehenden pandemischen Influenza-Viren helfen, bestehende Wirtsbarrieren zu überwinden (Scholtissek *et al.*, 1978; Naffakh *et al.*, 2008; Reperant *et al.*, 2012). Dies, im

Zusammenhang mit der Beobachtung, dass die pandemischen Viren von 1957 und 1968 neben einem HA-, ebenfalls ein PB1-Gensegment aviären Ursprungs tragen, wirft die seit langem bestehende Fragestellung auf, warum in beiden pandemischen Influenza-Viren ein gut an den Menschen adaptiertes humanes PB1 gegen ein aviäres PB1 ausgetauscht wurde. Bislang ist die biologische Signifikanz des aviären PB1 bei der Entstehung pandemischer Influenza-Viren unbekannt. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit die Entstehung der Pandemie von 1968 mit Hilfe reverser Genetik remodelliert, um die folgenden beiden Möglichkeiten untersuchen zu können:

- 1.) Das aviäre PB1 weist keine signifikante Wirtsrestriktion auf und wurde durch Zufall in beide pandemischen Viren.
- 2.) Das aviäre PB1-Gensegment unterbreitet, entweder seinerseits oder durch eine bislang nicht näher charakterisierte Interaktion mit dem aviären HA-Gensegment, den pandemischen Viren einen selektiven Vorteil.

V.1 Einfluss des human-adaptierten aviären PB1_{HK}-Gensegments auf die virale Replikations- und Übertragungseffizienz des pandemischen HK68-Virus

Der Einfluss des aviären PB1 auf die virale Replikation und Virulenz wurde in der Literatur kontrovers diskutiert. Taubenberger und Kash postulierten, dass das aviäre PB1 keine signifikante Wirtsrestriktion aufweist und ohne vorherige Adaptation ähnlich effizient, wie ein humanes PB1 in Säugerzellen replizieren kann (Taubenberger & Kash, 2010). Diese Hypothese stimmt mit der Beobachtung überein, dass die Evolutionsrate des aviären PB1 auf Grund seiner Funktion, im Vergleich zu den übrigen Komponenten des vRNP-Komplexes herabgesetzt ist (Naffakh *et al.*, 2008).

Im Gegensatz dazu wurden in vielen weiteren Studien positive Effekte des aviären PB1 auf die virale Replikationseffizienz beobachtet, die nahe legen dass ein reassortiertes aviäres PB1 pandemischen Influenza-Viren einen replikativen Vorteil unterbreitet. Demnach konnte interessanterweise in der Studie von Chen *et al.*, in der Reassortanten zwischen einem saisonalen H3N2-Virus und einem hochpathogenen humanen H5N1-Isolat untersucht wurden, beobachtet werden, dass das genotypisch dem pandemischen Virus von 1957 homologe Virus, sowohl eine hohe Replikationseffizienz in MDCK-Zellen aufwies, als auch zu den drei am höchsten virulenten Viren zählte (Chen *et al.*, 2008). Die Beobachtung, dass das

entsprechende Virus mit humanem PB1 eine geringere Virulenz in Mäusen zeigte, deutet daraufhin, dass bei Reassortierung aviärer PB1-Gene in humane, saisonale Viren deren Virulenz deutlich gesteigert werden kann. Diese Beobachtung wird durch die Studien von Pappas *et al.* und Watanabe *et al.* belegt. Diese konnten in Wachstumskurven auf MDCK- und NHBE-Zellen, sowie in Tierversuchen mit Mäusen und Frettchen zeigen, dass das aviäre PB1-Gen des pandemischen 1918-Virus die Replikationseffizienz, Virulenz und Pathogenität humaner, saisonaler H1N1-Viren erheblich steigern kann (Pappas *et al.*, 2008; Watanabe *et al.*, 2009).

Übereinstimmend mit diesen Daten konnte im Rahmen von Kompatibilitätsstudien gezeigt werden, dass das Einbringen eines aviären PB1 in einen humanen Polymerasekomplex sowohl dessen Replikationseffizienz, als auch dessen Polymerase-Aktivität steigert (Naffakh *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2009). In der Studie von Li *et al.* wurden rekombinante A/WSN/33 (H1N1)-Viren (WSN), die entweder das humane PB1 von WSN oder das aviäre PB1 von A/Indonesia/5/05 (H5N1) (Indo5) trugen, hinsichtlich ihrer Replikationseffizienz in MDCK-Zellen getestet. Hierbei war zu beobachten, dass Viren mit aviärem PB1 sowohl moderat größere Plaques, als auch in der frühen Replikationsphase (8 h p.i.) eine signifikant höhere Replikationseffizienz aufwiesen. Zusätzlich dazu wiesen die vRNP-Komplexe mit aviärem PB1 im Vergleich zu den Komplexen mit humanem PB1 eine 5-fach höhere Polymerase-Aktivität auf (Li *et al.*, 2009).

Naffakh *et al.* konnten in ihrer Studie, in der mittels Minigenom-Reporter-Assays die Kompatibilität der vRNP-Komponenten von A/Puerto Rico/8/34 (PR8), A/Viktoria/3/75 (VIC), A/Mallard/NY/6750/78 (MAL), A/Hong Kong/156/97 (HK) und A/FPV/Rostock/34 (FPV) untersucht wurde, ebenfalls zeigen, dass ein aviäres PB1 die Polymerase-Aktivität von humanen Polymerase-Komplexen erhöht. Allerdings war hierbei zu beobachten, dass die Erhöhung der viralen Polymerase-Aktivität durch das aviäre PB1 virusspezifisch erfolgt. So erhöhten die aviären PB1-Proteine von FPV und MAL, die Polymerase-Aktivität des PR8-Komplexes wesentlich deutlicher, als das aviäre PB1 von HK (Naffakh *et al.*, 2000). Dieser Effekt wird ebenfalls deutlich, wenn man die Erhöhung der Polymerase-Aktivitäten durch das aviäre PB1 in den Studien von Li *et al.* und Naffakh *et al.* miteinander vergleicht. Während das aviäre Indo5-PB1 die Polymerase-Aktivität des vRNP-Komplexes von WSN 5-fach erhöht, war die Erhöhung der Polymerase-Aktivität des vRNP-Komplexes von PR8 durch verschiedene aviäre PB1-Proteine in der Studie von Naffakh *et al.* deutlich weniger stark ausgeprägt. Zusammenfassend deuten die hier dargestellten Daten darauf hin, dass aviäre PB1-Proteine

sowohl die virale Replikationseffizienz, als auch die virale Polymerase-Aktivität virusspezifisch erhöhen können.

Jedoch wurden in den hier beschriebenen Studien humane Laborviren, wie WSN oder PR8, in Kombination mit hochpathogenen aviären H5- und H7-Viren verwendet, so dass auf Grund der virusspezifischen Erhöhung der viralen Polymerase-Aktivität, ausgehend von diesen Daten keine Aussage darüber getroffen werden kann, ob und in welchem Umfang das aviäre PB1 den entstehenden pandemischen Viren von 1957 und 1968 einen replikativen Vorteil unterbreitet hat. Um diese Fragestellung möglichst realitätsnah untersuchen zu können, wurde in der vorliegenden Arbeit die Pandemie von 1968 mit Hilfe von reverser Genetik remodelliert. Da beide an der Reassortierung beteiligten Viren unbekannt sind, wurden die jeweils zum pandemischen HK68-Virus nächstverwandten Viren verwendet. Ähnlich wie in der Studie von Li *et al.*, 2009 erhöhte das aviäre PB1 in den Wachstumskinetiken auf Calu-3-Zellen nur sehr moderat die virale Replikationseffizienz des humanen Ersatz-Vorläufervirus rCal66 (Abb. IV.4). Dennoch konnte in den kompetitiven Replikationsexperimenten gezeigt werden, dass das aviäre PB1 unter kompetitiven Bedingungen, unabhängig vom Ursprung des HA-Gensegments, den rCal-Viren einen deutlichen replikativen Vorteil unterbreitet (Abb. IV.7 und IV.8). In Folge dessen dominierten die rCal-Viren mit aviärem PB1 in den Virusmischungen und wurden zudem effizienter zwischen den Meerschweinchen übertragen (Abb. IV.10). Da des Weiteren gezeigt werden konnte, dass das aviäre PB1 die virale Polymerase-Aktivität der rCal-Viren zweifach erhöht (Abb. IV.19), könnte die erhöhte virale Replikationseffizienz der rCal-Viren mit aviärem PB1 von der erhöhten viralen Polymerase-Aktivität herrühren.

Zusammenfassend zeigen die in dieser Arbeit erzielten Daten, dass das aviäre PB1 nicht nur durch Zufall in die pandemischen Viren von 1957 und 1968 reassortiert wurde, sondern vermutlich in Folge einer Erhöhung der viralen Polymerase-Aktivität, den entstehenden pandemischen Viren einen replikativen Vorteil unterbreitet hat. Im Vergleich zu den Daten von Naffakh *et al.* und Li *et al.* belegen diese, dass die Erhöhung der Polymerase-Aktivität virusspezifisch erfolgt und deuten zudem darauf hin, dass auch moderate Erhöhungen der Polymerase-Aktivität einen replikativen Vorteil unterbreiten und damit zur Entstehung pandemischer Viren beitragen können.

V.1.1 Einfluss der im 3'NCR des PB1_{Cal}-Gensegments identifizierten Mutation G4 auf die virale Replikationseffizienz

Die nicht-kodierenden Sequenzbereiche (*non-coding region*; NCR) der viralen Gensegmente wurden erstmals 1979 durch Robertson *et al.* und ein Jahr später durch Desselberger *et al.* sequenziert. Bereits in diesen frühen Studien wurde beobachtet, dass an Nukleotidposition 4 im 3'NCR der viralen Gensegmente ein C/U-Polymorphismus zwischen den viralen Gensegmenten besteht (Robertson, 1979; Desselberger *et al.*, 1980). In der Studie von Robertson *et al.* konnte für das Virusisolat A/FPV/Rostock/34 (H1N1) gezeigt werden, dass die für die Polymerase-Untereinheiten kodierenden Gensegmente PB2, PB1 und PA an dieser Position für ein Cytosin kodieren, während die übrigen Gensegmente an gleicher Stelle ein Uracil aufweisen (Robertson, 1979). Dieser Polymorphismus wird durch die zur Etablierung von Reversen Genetik Systemen verwendeten Hoffmann-Primer dahingehend berücksichtigt, als dass die *Forward*-Primer entsprechend den Erkenntnissen von Robertson *et al.* die gleiche Signatur aufweisen (Hoffmann *et al.*, 2001). Allerdings war durch Vergleich der von Robertson *et al.* und Desselberger *et al.* beschriebenen Ergebnisse bereits zu beobachten, dass der C/U-Polymorphismus nicht nur zwischen den unterschiedlichen Gensegmenten besteht, sondern ebenfalls zwischen gleichen Gensegmenten unterschiedlicher Virusisolate. Dementsprechend wiesen die von Desselberger *et al.* veröffentlichten Sequenzen für die NA- und M-Gensegmente des Virusisolats A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) ein Cytosin, an Stelle des von Robertson *et al.* für das Virusisolats A/FPV/Rostock/34 (H1N1) beschriebenen Uracils auf. Diese Beobachtung wurde für weitere Gensegmente in späteren Studien, in denen die NCR-Sequenzen gleicher Gensegmente verglichen wurden, bestätigt (de Wit *et al.*, 2007; Wang & Lee, 2009). Somit wird durch die Hoffmann-Primer zwar der zwischen den unterschiedlichen Gensegmenten bestehende C/U-Polymorphismus berücksichtigt, jedoch wird nicht berücksichtigt, dass der C/U-Polymorphismus ebenfalls zwischen gleichen Gensegmenten unterschiedlicher Virusisolate besteht.

In dieser Arbeit wurden zur Etablierung des reversen Genetik Systems von A/California/1/66 (H2N2) ebenfalls Hoffmann-Primer verwendet. Jedoch wurde erst nach Etablierung des reversen Genetik Systems durch Sequenzierung der hochkonservierten NCR-Sequenzen bemerkt, dass das PB1-Gensegment des Wildtypisolats von A/California/1/66 (H2N2) an Position 4 im 3'NCR, nicht wie die Hoffmann-Primer ein Cytosin, sondern ein Uracil kodiert (IV.5.1; Abb. IV.11). Daher wurde durch Verwendung der Hoffmann-Primer in das PB1-

Gensegment der rCal66-Viren mit humanem PB1-Gen versehentlich die Nukleotid-Mutation PB1-U4C eingefügt, die entsprechend der cRNA-Schreibweise im Ergebnisteil (IV.5.1) als Mutation G4 bezeichnet wird.

In vorigen Studien wurden hinsichtlich des Einflusses dieser Mutation auf die virale Replikation und Genexpression unterschiedliche Effekte für verschiedene Gensegmente beobachtet.

Während von de Wit *et al.* beschrieben wird, dass diese Mutation in allen acht Gensegmenten keinen Einfluss auf die virale Replikation hat (de Wit *et al.*, 2004), wurde von Lee *et al.* mittels NMR-Spektroskopie gezeigt, dass sich die Promotorstrukturen von U4- und C4-Promotoren signifikant voneinander unterscheiden. Hierbei wurde beobachtet, dass im U4-Promotor die neun terminalen Nukleotide des 3'NCR eine Basenpaarung mit den terminalen Nukleotiden des 5'NCR eingehen, während im C4-Promotor die vier terminalen Nukleotide des 3'NCR flexibel vorliegen (Lee *et al.*, 2003). Ausgehend von dieser Beobachtung, sowie der Tatsache, dass zur Aktivierung der viralen Endonukleaseaktivität beide Enden in Basenpaarung vorliegen müssen (Hagen *et al.*, 1994), wurde die Hypothese aufgestellt, dass der U4-Promotor die Endonukleaseaktivität effizienter induzieren und daher eine höhere Transkriptionseffizienz aufweisen könnte als der C4-Promotor (Lee *et al.*, 2003).

Bereits in der Studie von Lee & Seong konnte für das NA-Gensegment gezeigt werden, dass Viren mit einem Uracil an Position 4 (U4), wie im PB1-Gen des A/California/1/66-Wildtypisolats gegeben, eine verzögerte vRNA-Synthese und eine verstärkte mRNA-Akkumulation aufweisen. Diese ging mit einer fünf- bis zehnfach erhöhten Virusreplikation einher (Lee & Seong, 1998). Von Jiang *et al.* wurde hingegen für das NS-Gensegment beschrieben, dass Viren mit einem Cytosin an Position 4 (C4), wie in den rCal-Viren mit humanem PB1 (rCal66 und rCal-HA_{HK}) gegeben, sowohl eine attenuierte Replikation als auch Transkription aufweisen (Jiang *et al.*, 2010). Somit wird zwar in beiden Studien belegt, dass U4-Viren tatsächlich eine erhöhte Transkriptionseffizienz aufweisen können, jedoch wird ebenfalls gezeigt, dass der C/U-Polymorphismus in verschiedenen Gensegmenten unterschiedliche Effekte auf die vRNA-Synthese und die virale Replikation hat. Diese Ergebnisse belegen, dass die viralen Gensegmente entsprechend ihrer Funktion im Virus unterschiedlich stark exprimiert werden (Desselberger *et al.*, 1980; Hoffmann *et al.*, 2001). Daher konnten diese Publikationen nicht herangezogen werden, um den Einfluss der Mutation G4 im PB1-Gensegment auf die virale Replikation und Transkription zu beurteilen.

Im Hinblick auf die mit den Viren rCal66 und rCal-HA_{HK} (C4) in dieser Arbeit erzielten Daten deuten diese Studien im schlimmsten Fall darauf hin, dass die Viren rCal66 und rCal-HA_{HK} lediglich auf Grund der versehentlich eingefügten Mutation G4 eine reduzierte Replikations- und Übertragungseffizienz, sowie eine reduzierte Polymerase-Aktivität aufweisen.

Um definitiv ausschließen zu können, dass die Mutation G4 die in den Abschnitten IV.3, IV.4 und IV.7.1 beschriebenen Daten beeinträchtigt, wurde die virale Replikationseffizienz von rCal-Viren, welche entweder ein Cytosin oder Uracil an Position 4 des PB1_{Cal}-Gensegments tragen, analog zu den in Abschnitt IV.3.4 dargestellten Daten bestimmt.

Im Rahmen von zwei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen mit jeweils zwei unabhängig voneinander hergestellten Plasmid-Stocks konnte kein signifikanter Einfluss von Mutation G4 auf die virale Replikationseffizienz festgestellt werden (Abb. IV.12 und Abb. IV.18).

Während dem Schreiben dieser Arbeit veröffentlichten Sun *et al.* eine Studie, in der gezeigt wird, dass rekombinante H5N1-Viren welche an Position 4 im 3'NCR des PB1-Gensegments ein Uracil (U4-Viren) kodieren, eine moderat erhöhte virale Replikationseffizienz und Virulenz aufweisen, die möglicherweise von der beobachteten erhöhten Transkriptionseffizienz des U4-Promotors herrührt (Sun *et al.*, 2014). Diese Daten stehen im Widerspruch zu den in dieser Arbeit erzielten Daten (Abb. IV.12 und Abb. IV.18).

Ein großer Nachteil der Studie von Sun *et al.* besteht darin, dass die Experimente nicht mit Viren durchgeführt wurden, welche mit Ausnahme des PB1-Gensegments in allen übrigen Gensegmenten die NCR-Sequenzen des Wildtypisolats enthielten. Stattdessen wurden rekombinante H5N1-Viren hergestellt, deren Gensegmente alle, mit Ausnahme des PB1-Gensegments, einen C4-Promotor enthielten. Auf Grund der bis dahin unbekannten NCR-Wildtypsequenzen wurden durch diese Vorgehensweise rekombinante Viren generiert, in denen nicht nur der Promotor des PB1-Gensegments, sondern in denen ebenfalls eine unbestimmte Anzahl von Promotoren der übrigen sieben viralen Gensegmente verändert wurden. In Folge dessen, ist unbekannt inwiefern die unbestimmte Anzahl der übrigen veränderten Promotoren die virale Genexpression und die virale Replikation beeinflussen. Daher könnten die im Widerspruch zu der vorliegenden Arbeit stehenden Daten darin begründet sein, dass die übrigen Nicht-PB1-Gensegmente in der Studie von Sun *et al.* nicht die wildtypische Promotorsequenz aufwiesen.

Die Herstellung von rekombinanten Viren mit künstlich veränderten Promotorsequenzen wird in der Publikation damit gerechtfertigt, dass der Einfluss des C/U-Polymorphismus im Hintergrund des Wildtypvirus nicht identifiziert werden konnte. Diese Tatsache deutet daraufhin, dass der in dieser Publikation dargestellte Effekt des C/U-Polymorphismus auf die virale Replikation, Transkription und Virulenz, nicht von diesem seinerseits, sondern vielmehr von der künstlich veränderten Expression der übrigen Gensegmente herrührt. Auf Grund dessen ist, sowohl in Hinblick auf die in der vorliegenden Arbeit generierten Daten, als auch in Hinblick auf die von Sun *et al.* publizierten Daten zu vermuten, dass sofern der C/U-Polymorphismus des PB1-Gensegments überhaupt einen Einfluss auf die virale Replikationseffizienz nimmt, dieser sehr gering ausfällt und weder mit den in dieser Arbeit gewählten Methoden, noch mit den von Sun *et al.* verwendeten Methoden signifikant nachgewiesen werden kann. Demzufolge kann der Schluss gezogen werden, dass die in der vorliegenden Arbeit identifizierte Mutation G4, die in den Abschnitten IV.3, IV.4 und IV.7.1 erzielten Daten nicht signifikant beeinträchtigt und somit deren Gültigkeit bestehen bleibt.

V.1.2 Lokalisation der Sequenzunterschiede zwischen dem humanen PB1_{Cal} und dem aviären PB1_{HK} und ihr möglicher Einfluss auf die viralen Eigenschaften

Die Kristallstruktur der vollständigen PB1-Untereinheit von Influenza-A-Viren konnte bislang noch nicht bestimmt werden. Daher ist momentan keine Aussage darüber möglich, in welchen strukturellen Domänen der viralen Polymerase die zwischen den PB1-Proteinen des Cal66- und HK68-Virus bestehenden Aminosäure-Sequenzunterschiede lokalisiert sind und inwiefern diese auf Grund von strukturellen Veränderungen Einfluss auf die virale Polymerase-Aktivität nehmen. Um dennoch einen Eindruck zu bekommen, ob die bestehenden Sequenzunterschiede möglicherweise in funktionellen Domänen der viralen Polymerase lokalisiert sind, wurde in einem Sequenzvergleich die für das PB1-Protein kodierende Aminosäuresequenz des humanen H2N2-Ersatzvorläufervirus Cal66 mit der des pandemischen HK68-Virus verglichen, und die für das PB1-Protein beschriebenen funktionellen Domänen in der Sequenz gekennzeichnet.

Da Sequenzunterschiede der auf dem PB1-Gensegment kodierten PB1-F2- und PB1-N40-Proteine ebenfalls Einfluss auf die viralen Eigenschaften der rCal66-Viren nehmen können, wurden deren Aminosäuresequenzen im Sequenzvergleich mit berücksichtigt. Neben der

Lokalisation der bestehenden Sequenzunterschiede zwischen den Genprodukten der PB1_{Cal}- und PB1_{HK}-Gene, wurde ebenfalls die Lokalisation beschriebener Mutationen beachtet (Abb. V.1).

Die von den PB1_{Cal}- und PB1_{HK}-Gensegmenten kodierten PB1-/PB1-N40-Proteine unterscheiden sich in dreizehn Aminosäure-Substitutionen, von denen fünf nahe der Polymerase-Motive (PB1-N261S, -R327K, V401A, -K430R, -N464D), eine unmittelbar neben dem Kernlokalisierungssignal (PB1-L212V) und die übrigen in den vRNA- und cRNA-Bindestellen lokalisiert sind (Abb. V.1A). Die identifizierten Substitutionen sind hierbei in zwei Gruppen zu unterteilen:

- 1.) Substitutionen, welche zwischen den PB1-Gensegmenten humanen und aviären Ursprungs bestehen und das PB1_{Cal}-Gensegment von den Gensegmenten PB1_{HK} und PB1_{HK-121/212/327} unterscheiden.

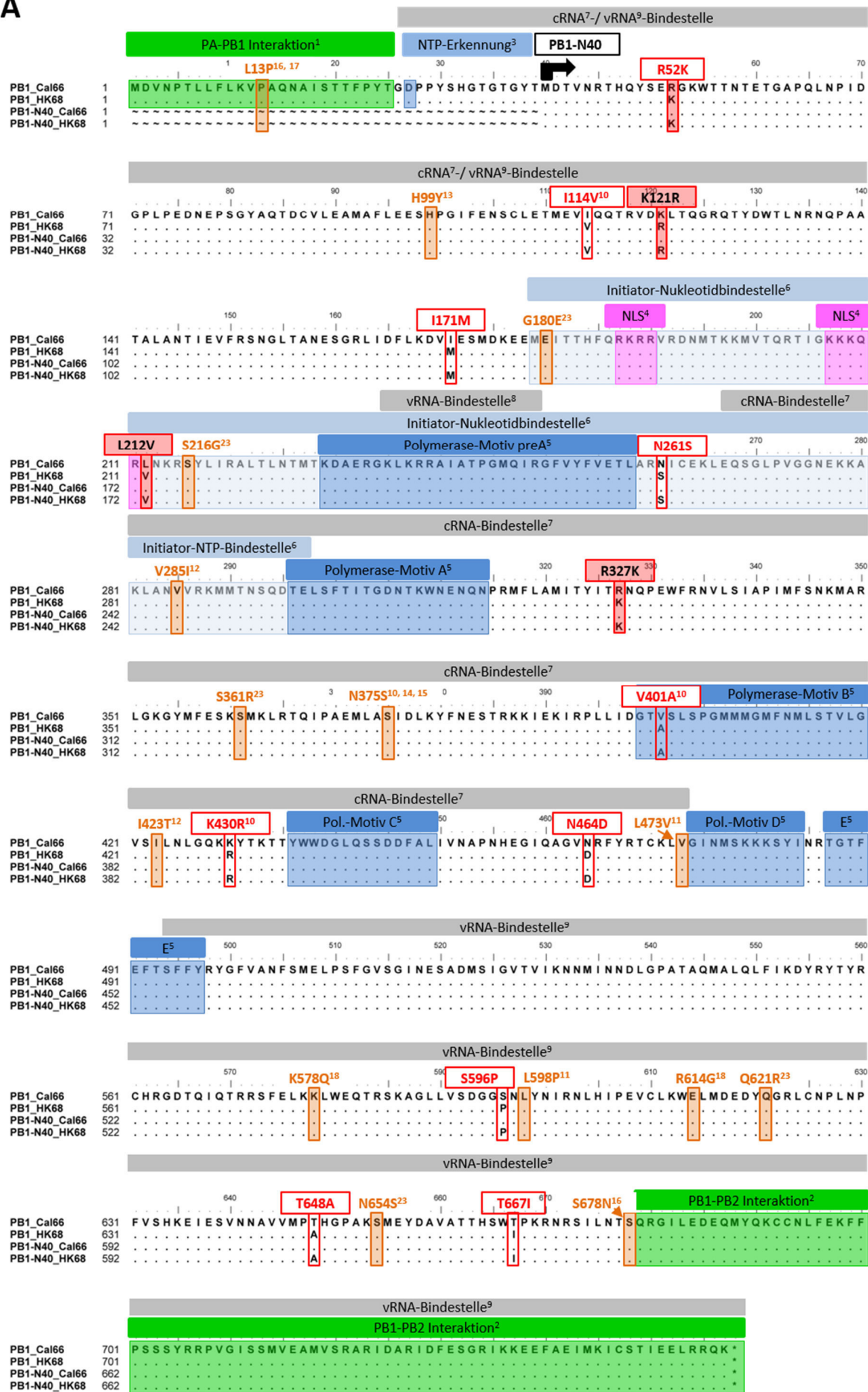
Bei diesen handelt es sich um die zehn Substitutionen PB1-R52K, -I114V, -I171M, -N261S, -V401A, -K430R, -N464D, -S596P, -T648A und -T667I.

- 2.) Human-adaptive Mutationen, welche erst während der Adaptation der initialen Reassortante an den Menschen entstanden sind und die Gensegmente PB1_{Cal} und PB1_{HK-121/212/327} von dem PB1_{HK}-Gensegment unterscheiden (IV.6).

Bei diesen handelt es sich um die drei Mutationen PB1-K121R, -L212V und R-327K.

Die in Abschnitt IV.6 identifizierten human-adaptiven Mutationen PB1-L212V und PB1-R327K des PB1_{HK} sind direkt neben dem Kernlokalisierungssignal, sowie zwischen den Polymerase-Motiven A und B lokalisiert. Die ebenfalls identifizierte human-adaptive Mutation PB1-K121R, liegt in einer cRNA/vRNA-Bindestelle und resultiert zusätzlich im PB1-F2-Protein in der Mutation PB1-F2-N90D, welche sich in unmittelbarer Nähe zum mitochondrialen Targeting-Signal (MTS) befindet.

A



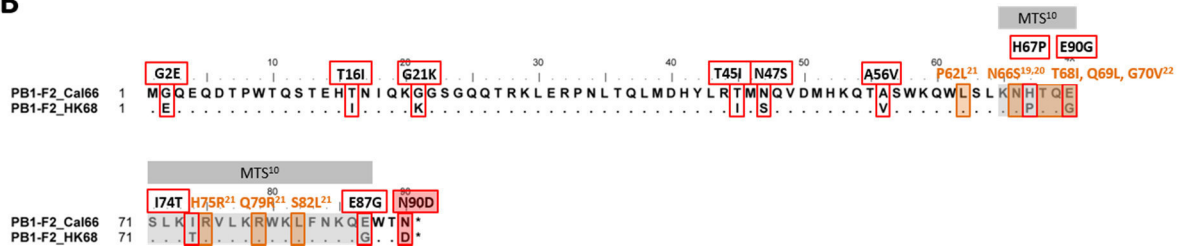
B

Abb. V.1: Lokalisation der bestehenden Sequenzunterschiede und der funktionellen Domänen innerhalb des (A) PB1- bzw. PB1-N40-Proteins und des (B) PB1-F2-Proteins von Cal66 und HK68. Die funktionellen Domänen der Proteine sind in Form von Balken über dem Aminosäure-Sequenzvergleich dargestellt. Bestehende Sequenzunterschiede zwischen den PB1-Genprodukten von Cal66 und HK68 sind im Sequenzvergleich **rot unterlegt** und die entsprechende Heterogenität ist in einem **roten Kasten** über dem Sequenzvergleich dargestellt. Die vier human-adaptiven Mutationen (PB1-K121R, -L212V, R327K und PB1-F2-N90D) des HK68-PB1 sind zusätzlich durch einen **rot unterlegten Kasten** gekennzeichnet. Bereits in vorigen Publikationen beschriebene PB1-/PB1-F2-Mutationen sind in **orange** unter Angabe der jeweiligen Publikation angegeben. ¹He *et al.*, 2008, Obayashi *et al.*, 2008; ²Poole *et al.*, 2007, Sugiyama *et al.*, 2009; ³Binh *et al.*, 2014; ⁴Nath & Nayak, 1990; ⁵Müller *et al.*, 1994, Biswas & Nayak, 1994; ⁶Kolpashchikov *et al.*, 2004; ⁷Gonzalez & Ortin, 1999; ⁸Jung & Brownlee, 2006; ⁹Gonzalez & Ortin, 1999; ¹⁰Taubenberger *et al.*, 2005; ¹¹Xu *et al.*, 2012; ¹²Octaviani *et al.*, 2011; ¹³Linster *et al.*, 2014; ¹⁴Kawaoka *et al.*, 1989; ¹⁵Wong *et al.*, 2011; ¹⁶Gabriel *et al.*, 2005; ¹⁷de Jong *et al.*, 2006; ¹⁸Shinya *et al.*, 2007; ¹⁹Conenello *et al.*, 2007, 2011; ²⁰Schmolke *et al.*, 2011; ²¹Alymova *et al.*, 2011; ²²Alymova *et al.*, 2014; ²³Plant *et al.*, 2012

Im Rahmen meiner Diplomarbeit, in der die Wirkung der human-adaptiven Mutationen PB1-K121R, -L212V und R-327K untersucht wurde, konnte bereits gezeigt werden, dass die Mutation PB1-K121R, sowohl in Kombination mit Mutation PB1-L212V, als auch in Kombination mit Mutation PB1-R327K für die erhöhte virale Polymerase-Aktivität des pandemischen HK68-Virus verantwortlich ist (Wendel, 2008).

In der vorliegenden Arbeit konnte zudem für genannte Mutations-Kombinationen gezeigt werden, dass diese bei der Adaptation der Reassortante an den Menschen die Polymerase-Genauigkeit kurzzeitig herabsetzten (Abb. IV.22).

Zusätzlich konnte in meiner Diplomarbeit für die Kombination der Mutationen PB1-K121R und PB1-L212V gezeigt werden, dass diese mit einer verringerten mittleren Todeszeit (*mean death time*, MDT) in embryonierten Hühnereiern einhergeht (Wendel, 2008). Diese Daten implizieren, dass die Mutation PB1-K121R eine zentrale Rolle bei der Adaptation an den Menschen einnimmt und sowohl die virale Polymerase-Aktivität und Mutations-Frequenz, als auch die Virulenz erhöht.

Bei den Mutationen PB1-K121R, -L212V und R-327K handelt es sich jedoch um human-adaptive Mutationen, welche erst nach Reassortierung des Virus auftraten. Diese optimierten die bereits erhöhte Polymerase-Aktivität des nicht-adaptierten aviären PB1 (Abb. IV.21) und stellten zusammen nach Adaptation die zur Etablierung einer neuen Viruslinie herabgesetzte Polymerase-Genauigkeit wieder her (Tab. IV.6 und Abb. IV.22). Da jedoch bereits das nicht-adaptierte aviäre PB1_{HK-121/212/327} im Vergleich zum humanen PB1_{Cal}, sowohl eine erhöhte Replikationseffizienz (Abb. IV.18), als auch eine erhöhte Polymerase-Aktivität (Abb. IV.21) aufwies, müssen die übrigen zehn zwischen dem humanen PB1_{Cal} und dem aviären PB1_{HK-121/212/327} bestehenden Sequenzunterschiede (Abb. V.1 A), ebenfalls zu einer Erhöhung der viralen Replikationseffizienz, vermutlich in Folge der erhöhten Polymerase-Aktivität, beigetragen haben. Diesbezüglich sind insbesondere, die nahe bzw. in den Polymerase-Motiven lokalisierten Mutationen PB1-N261S, -V401A, -K430R und -N464D interessant, sowie Mutation PB1-I114V, welche nahe der Mutation PB1-K121R, ebenfalls in der cRNA/vRNA-Bindestelle lokalisiert ist (Abb. V.1 A).

Neben diesen ist zudem Mutation PB1-S596P interessant, welche direkt neben der von Xu *et al.* beschriebenen Mutation PB1-L598P in einer vRNA-Bindestelle liegt (Abb. V.1 A). Für die Mutation PB1-L598P wurde beschrieben, dass diese zusammen mit der Mutation PB1-L473V im Hintergrund des WSN-Virus für die erhöhte virale Replikationseffizienz und Polymerase-Aktivität eines aviären H5N1-PB1 verantwortlich ist (Xu *et al.*, 2012).

Neben den Sequenzunterschieden zwischen den PB1-/PB1-N40-Proteinen von Cal66 und HK68, bestehen ebenfalls elf Sequenzunterschiede im PB1-F2-Protein, von denen vier (PB1-F2-H67P, -E70G, -I74T und -E87G) im MTS liegen. Die aus der Mutation PB1-K121R resultierende human-adaptive PB1-F2-Mutation N90D ist ebenfalls in unmittelbarer Nähe zum MTS lokalisiert (Abb. V.1 B).

Für das MTS ist bekannt, dass dieses eine wichtige Rolle bei der durch das PB1-F2-Protein induzierten Apoptose spielt (Chakrabarti & Pasricha, 2013) und die bekannte Pathogenitätsdeterminante PB1-F2-N66S enthält (Conenello *et al.*, 2007; Conenello *et al.*, 2011; Schmolke *et al.*, 2011). Daneben wurden für dieses sowohl Cytotoxizitätsdeterminanten (Alymova *et al.*, 2014), als auch eine proinflammatorische Domäne (Alymova *et al.*, 2011) beschrieben. Jedoch wurde bislang keiner der bestehenden Sequenzunterschiede in der Literatur beschrieben, so dass über mögliche Effekte dieser Sequenzunterschiede bislang nur spekuliert werden kann.

V.2 Haben mögliche Interaktionen zwischen den HA- und PB1-Gensegmenten mit zur Entstehung des pandemischen HK68-Virus beigetragen?

Die Hypothese, dass möglicherweise bestehende Interaktionen zwischen den aviären HA- und PB1-Gensegmenten zur Entstehung der pandemischen Influenza-Viren von 1957 und 1968 beigetragen haben könnten, wurde erstmals 1989 von Kawaoka *et al.* aufgestellt (Kawaoka *et al.*, 1989). Diese beruht darauf, dass zur damaligen Zeit lediglich für die Gensegmente der viralen Oberflächenglykoproteine bekannt war, dass diese von Vogel- auf Säugetierspezies übertragen werden können. Für die internen Gene wurde hingegen beobachtet, dass diese zusammen mit dem aviären HA ebenfalls zwischen den Spezies übertragbar zu sein scheinen (Kawaoka *et al.*, 1989). Basierend auf dieser Beobachtung wurde die Hypothese aufgestellt, dass möglicherweise zwischen den HA- und PB1-Gensegmenten Interaktionen bestehen könnten, welche die Übertragbarkeit vom aviären PB1 auf Säugetierspezies ermöglichen.

Hinweise, dass derartige Interaktionen möglicherweise in einer erhöhten Replikationseffizienz der pandemischen Viren resultiert haben könnten, lieferten Impfstoff-Studien. In diesen wurden die Genotypen verschiedener zur Impfstoffherstellung verwendeter Saatviren hinsichtlich ihrer Replikations- und Reassortierungseffizienz untersucht (de Wit *et al.*, 2004; Rudneva *et al.*, 2007; Wanitchang *et al.*, 2010). Hierbei war zu beobachten, dass sogenannte 5+3-Reassortanten, welche die HA-, NA- und PB1-Gensegmente des jeweiligen saisonalen Impfvirus, sowie die restlichen fünf Gensegmente des reassortierungs-effizienten Virusstamms A/Puerto Rico/8/34 (H1N1, PR8) trugen, abhängig vom Stamm des Impfvirus eine deutlich erhöhte Replikationseffizienz aufwiesen. Die Tatsache, dass die jeweiligen 6+2- bzw. 7+1-Reassortanten, welche lediglich die HA- und NA-Gensegmente bzw. nur das HA-Gensegment des Impfvirus trugen, eine reduzierte Replikationseffizienz aufwiesen, deutet darauf hin, dass möglicherweise bestehende Interaktionen zwischen den homologen HA- und PB1-Gensegmenten der 5+3-Reassortanten die virale Replikationseffizienz erhöhten. Diese Interaktionen könnten möglicherweise zwischen den Gensegmenten auf vRNA-Ebene bestehen und von einer effizienteren Verpackung des zum HA homologen PB1-Gensegments herrühren. Gestützt wird diese Hypothese durch die Publikation von Cobbin *et al.*, in der mittels klassischer Ei-Reassortierung zwischen den Viren A/Udorn/307/72 (H3N2; Udorn) und PR8 gezeigt werden konnte, dass nach zwei Passagen 75% der Reassortanten das saisonale Udorn-PB1 enthielten, während lediglich in 25% der Reassortanten das PR8-PB1 nachgewiesen werden konnte (Cobbin *et al.*, 2013).

Hinweise, dass zwischen den acht viralen Gensegmenten RNA-RNA-Interaktionen bestehen, lieferten Studien in denen die Verpackung der viralen Gensegmente in Nachkommenviren untersucht wurde. Im Rahmen dieser Studien konnte erst kürzlich von Fournier *et al.* mittels Elektronentomographie gezeigt werden, dass die viralen Gensegmente als supramolekulare Komplexe in Virionen verpackt werden. Innerhalb dieser Komplexe gehen die segment-spezifischen Verpackungssignale der viralen Gensegmente in einer sogenannten „Übergangszone“ (*transition zone*) direkte Basenpaarungen mit anderen Gensegmenten ein (Fournier *et al.*, 2012a). Diese Basenpaarungen tragen mit zu der beobachteten, distinkten 7+1-Konformation der Gensegmente in Virionen bei (Noda *et al.*, 2006), innerhalb derer jeweils eines der vier größten viralen Gensegmente PB2, PB1, PA und HA die mittlere Position einnimmt (Noda *et al.*, 2012). Zusammen mit den Beobachtungen, dass in die Virionen jeweils eines der acht verschiedenen Gensegmente spezifisch verpackt wird (Chou *et al.*, 2012) und Mutationen sowie Deletionen der segment-spezifischen Verpackungssignale in reduzierten Verpackungseffizienzen anderer Gensegmente resultieren (Marsh *et al.*, 2007; Hutchinson *et al.*, 2009), deuten diese Publikationen eindeutig auf bestehende spezifische RNA-Interaktionen zwischen den Gensegmenten hin.

Obwohl bekannt ist, dass zwischen den Gensegmenten spezifische Interaktionen bestehen (Marsh *et al.*, 2007; Hutchinson *et al.*, 2009; Chou *et al.*, 2012; Noda *et al.*, 2012; Fournier *et al.*, 2012b) und gezeigt werden konnte, dass mögliche Inkompatibilitäten zwischen den Verpackungssignalen der Gensegmente in reduzierten Reassortierungseffizienzen resultieren (Downie, 2004; Essere *et al.*, 2013), ist bislang unbekannt welche Gensegmente miteinander interagieren und inwiefern die Reassortierung der pandemischen Viren von 1957 und 1968 durch Inkompatibilitäten zwischen den Gensegmenten beeinflusst wurde.

Des Weiteren gilt zu beachten, dass sowohl in dieser Arbeit, als auch in weiteren Publikationen gezeigt werden konnte, dass erhöhte virale Replikationseffizienzen mit erhöhten Polymerase-Aktivitäten einhergehen können (IV.7; Li *et al.*, 2009; Wanitchang *et al.*, 2010). Daher bleibt unklar zu welchem Anteil, neben der erhöhten Polymerase-Aktivität, mögliche Interaktionen zwischen den HA- und PB1-Gensegmenten zu einer erhöhten Verpackungseffizienz und in Folge dessen zu einer erhöhten viralen Replikationseffizienz beigetragen haben.

Bezüglich der hypothetischen HA-PB1-Interaktionen gilt es weiterhin aufzuklären, ob die in den beschriebenen Studien beobachtete erhöhte virale Replikationseffizienz von Viren mit homologen HA- und PB1-Gensegmenten ein allgemeingültiges Phänomen oder vielmehr ein

für das PR8-Virus spezifisches Phänomen darstellt. Bislang konnte dieses Phänomen lediglich im Rahmen der beschriebenen Impfstoff-Studien beobachtet werden (de Wit *et al.*, 2004; Rudneva *et al.*, 2007; Wanitchang *et al.*, 2010; Cobbin *et al.*, 2013), deren Reassortanten standardmäßig im Hintergrund des reassortierungs-effizienten PR8-Virus hergestellt werden.

Um zu untersuchen, ob dieses Phänomen ebenfalls auf pandemische Influenza-Viren zutrifft, wurden in der vorliegenden Arbeit die Replikationseffizienzen der Viren des PB1-Paares mit denen der Viren des HA+PB1-Paares (Tab. IV.2) in kompetitiven Rescue-Experimenten (IV.3.4; IV.5.2; IV.6.3) und Koinfektionsstudien (IV.3.3) verglichen.

In beiden kompetitiven Experimenten, welche in mindestens zweifacher Bestimmung mit mindestens zwei unabhängig voneinander hergestellten Plasmid- bzw. Virusstocks durchgeführt wurden, konnte kein signifikanter replikativer Unterschied zwischen den PB1- und HA+PB1-Paaren festgestellt werden (Abb. IV.7, Abb. IV.8, Abb. IV.12 und Abb. IV.18). In beiden Experimenten wiesen die rCal-Viren mit aviärem PB1 (rCal66-PB1_{HK} und rCal-(HA+PB1)_{HK}) einen signifikanten replikativen Vorteil gegenüber den Viren mit humanem PB1 (rCal66 und rCal-HA_{HK}) auf. Hierbei war kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Replikationseffizienz der Viren mit aviärem PB1 und homologen (rCal-(HA+PB1)_{HK}) bzw. heterologen HA (rCal66-PB1_{HK}) zu erkennen. Dementsprechend geben diese Daten keinerlei Hinweise darauf, dass eine möglicherweise bestehende HA-PB1-Interaktion die virale Replikationseffizienz des pandemischen HK68-Virus erhöht haben könnte.

Somit konnte in dieser Arbeit erstmals gezeigt werden, dass das aviäre PB1 des pandemischen HK68-Virus unabhängig vom Ursprung des HA reassortiert wurde und vermutlich in Folge einer erhöhten viralen Polymerase-Aktivität (IV.7) unabhängig von möglichen HA-PB1-Interaktionen die virale Replikations- (IV.3.3, IV.3.4) und Übertragungseffizienz (IV.4.2) des pandemischen HK68-Virus erhöht hat. Möglicherweise bestehende HA-PB1-Interaktionen zwischen den homologen aviären HA- und PB1-Gensegmenten, sowie mögliche Inkompatibilitäten zwischen den Verpackungssignalen der humanen HA- und aviären PB1-Gensegmente, die unter kompetitiven Bedingungen in Reassortierungs-Restriktionen resultieren (Essere *et al.*, 2013), können entsprechend der in dieser Arbeit erzielten Daten ausgeschlossen werden und haben bei der Entstehung des pandemischen HK68-Virus keine signifikante Rolle gespielt.

Entsprechend dieser Erkenntnisse stellt die im Rahmen von Impfstoffstudien gemachte Beobachtung, dass sogenannte 5+3-Reassortanten mit homologen HA- und PB1-Gensegmenten eine höhere virale Replikation aufweisen, kein allgemeingültiges Phänomen dar, sondern muss viel eher als virusspezifische Eigenschaft des PR8-Virus betrachtet werden. Diesbezüglich konnte in retrospektiven Analysen, in denen die genotypische Zusammensetzung von verschiedenen Impfstoffviren (Fulvini *et al.*, 2011; Cobbin *et al.*, 2013), als auch die von verschiedenen reassortanten Schweineviren (Khiabanian *et al.*, 2009) untersucht wurde, beobachtet werden, dass das PB1-Gensegment zwar das am häufigsten reassortierte interne Gensegment darstellt, jedoch nur in 50-60% der Reassortierungs-Ereignisse reassortiert wird. Zudem konnte in mehreren Studien gezeigt werden, dass das PB1 des PR8-Virus im Vergleich zu verschiedenen PB1-Proteinen pandemischer H1N1, saisonaler H1N1, sowie hochpathogener H5N1-Viren eine reduzierte Polymerase-Aktivität aufweist (Naffakh *et al.*, 2000; de Wit *et al.*, 2004; Wanitchang *et al.*, 2010).

Entsprechend dieser Publikationen und in Übereinstimmung mit den in dieser Arbeit erzielten Daten ist anzunehmen, dass die in Impfstoffstudien beobachtete erhöhte virale Replikations- und Reassortierungseffizienz der 5+3-Reassortanten vielmehr auf einer Erhöhung der viralen Polymerase-Aktivität durch ein replikationseffizienteres, saisonales PB1 beruhen, als auf einer effizienteren Verpackung des zum HA homologen PB1-Gensegments. In Folge dessen ist die Schlussfolgerung zu ziehen, dass zumindest bei der Reassortierung des pandemischen HK68-Virus das aviäre PB1-Gensegment nicht in Folge einer HA-PB1-Interaktion gegen das humane PB1 ausgetauscht wurde, sondern dass dieses unabhängig vom HA-Gensegment zu Gunsten einer erhöhten viralen Polymerase-Aktivität reassortiert wurde.

V.3 Hätte ein an der Reassortierung beteiligtes nicht human-adaptiertes aviäres PB1-Gensegment ebenfalls zur Entstehung des pandemischen HK68-Virus beigetragen?

Das pandemische HK68-Virus ging aus der Reassortierung eines humanen H2N2 Virus und eines aviären H3-Virus hervor. Während der Ursprung der einzelnen Gensegmente des pandemischen HK68-Virus bestimmt werden konnte (Scholtissek *et al.*, 1978; Kawaoka *et al.*, 1989), ist das humane H2N2- und das aviäre H3-Vorläufervirus, welche unmittelbar an der Reassortierung des pandemischen HK68-Virus beteiligt waren, unbekannt. Demzufolge ist ebenfalls unbekannt, ob das aviäre H3-Vorläufervirus vor der Reassortierung eine Evolution in einer oder mehreren Wirtsspezies, wie etwa domestiziertem Geflügel oder Schweinen durchlaufen hat, oder ob dieses direkt vom aviären Wirtsreservoir auf den Menschen übertragen wurde. Auf Grund dessen kann keine Aussage darüber getroffen werden, in welcher Wirtsspezies die Reassortierung stattgefunden hat und ob das humane Vorläufervirus möglicherweise vor Reassortierung ebenfalls eine Evolution in einer anderen Wirtsspezies, wie dem Schwein das als „Mischgefäß“ (mixing vessel) für Genreassortierungen gilt (Scholtissek *et al.*, 1991), durchlaufen hat. Ausgehend von diesen Möglichkeiten erscheinen zwei Reassortierungs-Szenarien als wahrscheinlich: Entweder das aviäre H3-Vorläufervirus hat vor Reassortierung eine Evolution in anderen Wirtsspezies durchlaufen und die Reassortierung hat entweder im Schwein oder im Menschen stattgefunden (Abb. IV.13 A, B); oder das aviäre Vorläufervirus wurde direkt auf den Menschen übertragen, in dem die Reassortierung stattfand (Abb. IV.13 C). Angenommen, die Reassortierung hat im ersten Fall im Schwein stattgefunden, so ist für das humane H2N2-Vorläufervirus anzunehmen, dass dieses ebenfalls vor Reassortierung eine Evolution in einer anderen Wirtsspezies, vermutlich dem Schwein, durchlaufen hat. Ggesetzt den Fall, in einem der beiden Szenarien hat die Reassortierung im Menschen stattgefunden, so bleibt ungewiss, ob die Reassortierung direkt nach Übertragung des aviären Vorläufervirus auf den Menschen mit einem nicht-adaptierten aviären PB1 stattgefunden hat oder ob dieses auf Grund voriger mehrfacher direkter Übertragung auf den Menschen bereits human-adaptive Mutationen aufgewiesen hat. Demzufolge kann ebenfalls keine Aussage darüber getroffen werden, wie stark die Gensegmente aviären Ursprungs bei Reassortierung bereits an den Menschen adaptiert waren. Um diese Tatsache, sowie die Möglichkeit zu berücksichtigen, dass die Reassortierung sowohl im oberen Respirationstrakt des Menschen bei einer Körpertemperatur von 33°C,

sowie im Schwein bei einer Körpertemperatur von 39°C stattgefunden haben kann, wurde die Reassortierung des pandemischen HK68-Virus sowohl bei unterschiedlichen Temperaturen, als auch mit unterschiedlich stark human-adaptierten PB1-Plasmiden, im Rahmen von kompetitiven Rescue-Experimenten remodelliert (IV.3.4, IV.5.2 und IV.6.3). Hierbei war zu beobachten, dass sowohl das human-adaptierte aviäre PB1_{HK}, als auch das nicht-adaptierte aviäre PB1 (PB1_{HK-121/212/327}) unabhängig vom Ursprung des HA eine erhöhte Reassortierungseffizienz gegenüber dem humanen PB1 aufwiesen (Abb. IV.18). Diese könnte auf die erhöhte Polymerase-Aktivität des aviären PB1 zurückzuführen sein, die selbst für das nicht-adaptierte aviäre PB1 noch 1,5-fach gegenüber dem humanen PB1 erhöht war (Abb. IV.21). Dementsprechend ist zu vermuten, dass selbst bei direkter Übertragung des aviären H3-Vorläufervirus auf den Menschen und unmittelbarer Reassortierung, das nicht-adaptierte aviäre PB1 auf Grund einer geringfügig erhöhten Polymerase-Aktivität vermutlich dem pandemischen HK68-Virus einen replikativen Vorteil unterbreitet und damit zu dessen Entstehung beigetragen haben könnte. Da in keinem der Versuche Unterschiede in der Reassortierungseffizienz zwischen den beiden rCal66-Viruspaaren festgestellt wurden, ist anzunehmen dass die erhöhte Reassortierungseffizienz alleinig durch die erhöhte Polymerase-Aktivität des aviären PB1-Proteins bedingt wird und mögliche HA-PB1-Interaktionen diesbezüglich keine Rolle spielen.

Übereinstimmend mit den Daten von Li *et al.*, die zeigen konnten, dass virale Polymerasekomplexe mit der Kombination humanes PB2 – aviäres PB1 gegenüber anderen Polymerase-Kombinationen über einen weiten Temperaturbereich (32°C – 40°C), die höchste Polymerase-Aktivität aufweisen (Li *et al.*, 2009), konnte auch bei den in dieser Arbeit durchgeführten kompetitiven Rescue-Experimenten kein Einfluss der Temperatur auf die Reassortierungseffizienz beobachtet werden. Sowohl bei einer Temperatur von 37°C, als auch bei einer Temperatur von 33°C wiesen die Viren mit aviärem PB1 jeweils die größte Reassortierungseffizienz auf (Abb. IV.8, IV.12 und IV.18).

Zusammenfassend ist aus diesen Daten zu schließen, dass das aviäre PB1 unabhängig von seinem Adaptierungsgrad an den Menschen und unabhängig vom Ursprung des HA, sowohl bei Reassortierung im Schwein (39°C), als auch bei Reassortierung im Menschen (33°C) gegenüber dem humanen PB1 eine erhöhte Reassortierungseffizienz aufgewiesen hat. Für diese ist vermutlich die gegenüber dem humanen PB1 deutliche erhöhte Polymerase-Aktivität verantwortlich, die wie Li *et al.* zeigten, über einen weiten Temperaturbereich erhöht bleibt.

Demzufolge ist zu vermuten, dass selbst das nicht-adaptierte aviäre PB1, auf Grund einer minimal erhöhten Polymerase-Aktivität dem reassortanten Virus, sowohl im Menschen als auch im Schwein, unabhängig von HA-PB1-Interaktionen, einen replikativen Vorteil unterbreitet und damit zur Entstehung des pandemischen HK68-Virus beigetragen haben könnte.

V.4 Haben möglicherweise veränderte, virale Polymerase-Genauigkeiten mit zu der Entstehung des pandemischen HK68-Virus beigetragen?

Bereits 1993 hat Scholtissek *et al.* postuliert, dass eine vorübergehend herabgesetzte Polymerase-Genauigkeit erforderlich ist, um einem neu in Säugetiere eingebrachten aviären Influenza-Virus eine schnelle Adaptation an die neue Wirtsspezies und somit die Ausbildung einer neuen Viruslinie zu ermöglichen (Scholtissek *et al.*, 1993). Übereinstimmend mit dieser Hypothese und unter Voraussetzung, dass an der Reassortierung das nicht-adaptierte aviäre PB1 beteiligt war, konnte in dieser Arbeit für die Entstehung der Pandemie von 1968 gezeigt werden, dass durch das Einbringen des nicht-adaptierten aviären PB1 in den humanen Polymerasekomplex des Cal66-Virus zeitweilig dessen Polymerase-Genauigkeit reduziert wurde (Tab. IV.6). Dies resultierte vermutlich in einer breiteren Quasi-Spezies Diversität, die es dem Virus erleichterte sich an die neue Wirtsspezies zu adaptieren. Der Polymerase-Komplex des pandemischen HK68-Virus mit human-adaptiertem aviären PB1 wies hingegen eine deutlich erhöhte Polymerase-Genauigkeit auf (Tab. IV.6) und stellte somit die dauerhafte Etablierung der am besten an den Menschen adaptierten Viren und damit die Ausbildung einer neuen Viruslinie sicher. In weiterführenden Experimenten konnte für den Polymerasekomplex des pandemischen HK68-Virus gezeigt werden, dass die Mutation PB1-K121R, sowohl in Kombination mit Mutation PB1-L212V, als auch in Kombination mit Mutation PB1-R327K für dessen erhöhte Polymerase-Genauigkeit verantwortlich ist (Abb. IV.22). Damit nimmt diese Mutation nicht nur, wie in Abschnitt V.1.2 diskutiert, bei der Erhöhung der Polymerase-Aktivität und Virulenz (Wendel, 2008) eine Schlüsselrolle ein, sondern hat ebenfalls einen deutlichen Einfluss auf die virale Polymerase-Genauigkeit. Bislang ist nicht bekannt, ob Mutation PB1-K121R alleinig oder nur in Kombination mit einer der beiden anderen Mutationen für die Reduktion der Polymerase-Genauigkeit verantwortlich ist. Die Tatsache, dass jedoch das rHK68-Virus, welches alle drei human-adaptiven Mutationen im

aviären PB1 kodiert, eine deutlich erhöhte Polymerase-Genauigkeit aufweist (Abb. IV.22), lässt vermuten, dass das Vorhandensein aller drei human-adaptiven Mutationen den Einfluss von Mutation PB1-K121R kompensiert und zu einer wieder hergestellten Polymerase-Genauigkeit führt. Allerdings ist bislang noch unklar, ob eine spezifische Mutation für die erhöhte Polymerase-Genauigkeit des PB1_{HK} verantwortlich ist, oder ob diese vielmehr von der Kombination der human-adaptiven Mutationen herrührt. Um diese Fragestellung aufzuklären, müssen zukünftig Einzelmutanten, sowie Viren welche alle möglichen Kombinationen der adaptiven Mutationen enthalten, hinsichtlich ihrer Polymerase-Genauigkeit untersucht werden.

Da der Einfluss der adaptiven Mutationen, auf Grund der bislang noch unbekannten Kristallstruktur der PB1-Untereinheit, nur anhand ihrer Nähe zu funktionellen Domänen vermutet werden kann, ist ebenfalls unbekannt, welche genauen strukturellen Veränderungen in der viralen Polymerase letztlich die herabgesetzte Polymerase-Genauigkeit bedingen. Dementsprechend bleibt ebenfalls ungeklärt, inwiefern und durch welchen Mechanismus andere human-adaptive Mutationen in der Lage sind, den Einfluss von Mutation PB1-K121R zu kompensieren.

V.5 Modell zur Entstehung der Pandemie von 1968

Im Rahmen dieser Arbeit konnte erstmals für ein pandemisches Influenza-Virus gezeigt werden, dass das aviäre PB1 unabhängig vom homologen HA, sowohl die virale Replikationseffizienz, als auch die virale Übertragungseffizienz, vermutlich in Folge einer erhöhten viralen Polymerase-Aktivität steigert und damit wesentlich zur Entstehung von Pandemien beitragen kann.

Die in der vorliegenden Arbeit erzielten Daten lassen sich in folgendem Modell zur Entstehung der Pandemie von 1968 zusammenfassen:

Die Reassortierung des pandemischen HK68-Virus erfolgte in einer unbekannten Wirtsspezies, wie etwa dem Schwein oder dem Menschen bei einer Körpertemperatur von 39°C oder 33°C. Daher ist unbekannt, ob und wie stark das aviäre PB1 bei Reassortierung bereits an den Menschen adaptiert war (Abb. V.2 A1). Dennoch konnte gezeigt werden, dass selbst bei unmittelbarer Reassortierung im oberen Respirationstrakt des Menschen, das Einbringen

eines nicht-adaptierten aviären PB1 in den humanen Polymerasekomplex des humanen H2N2-Vorläufervirus in einer signifikant erhöhten viralen Replikationseffizienz resultierte. Dies erfolgte unabhängig vom Ursprung des HA-Gensegments und der Körpertemperatur der Wirtsspezies und ist vermutlich auf die moderat erhöhte Polymerase-Aktivität des nicht-adaptierten aviären PB1 zurückzuführen (Abb. V.2 B1); wenn auch weitere, bislang nicht-identifizierte Mechanismen, die zu diesem Effekt möglicherweise beitragen, nicht auszuschließen sind. Neben der Erhöhung der viralen Replikationseffizienz, resultierte das Einbringen eines nicht-adaptierten aviären PB1 in den humanen Polymerasekomplex zudem in einer reduzierten Polymerase-Genauigkeit (Abb.V.2 C1). Diese wird entweder alleine durch die adaptive Mutation PB1-K121R oder durch die Kombination der human-adaptiven Mutationen PB1-K121R und PB1-L212V, sowie PB1-K121R und PB1-R327K bedingt und lässt vermuten, dass genannte Mutationen möglicherweise bereits im an der Reassortierung beteiligten aviären PB1 enthalten waren. Die reduzierte Polymerase-Genauigkeit führte auf Grund einer erhöhten Mutationsfrequenz zu einer breiten Quasispezies-Diversität, welche wiederum eine effiziente Adaptation der initialen Reassortante an den Menschen erlaubte. Während der Adaptation des aviären PB1 an den Menschen traten die human-adaptiven Mutationen PB1-K121R, -L212V und -R327K im PB1-Gensegment auf, von denen die Mutation PB1-K121R in der PB1-F2-Mutation N90D resultierte (Abb. V.2 A2). Die Kombinationen der human-adaptiven Mutationen PB1-K121R und PB1-L212V, sowie PB1-K121R und PB1-R327K erhöhten wiederum die virale Polymerase-Aktivität und optimierten in Folge dessen die virale Replikationseffizienz (Abb. V.2 B2). Neben einer Optimierung der viralen Replikationseffizienz stellten die drei human-adaptiven Mutationen ebenfalls die virale Polymerase-Genauigkeit wieder her und sicherten damit die Etablierung der am besten an den Menschen angepassten Viren, sowie die Ausbildung der neuen Viruslinie in der menschlichen Bevölkerung (Abb. V.2 C2).

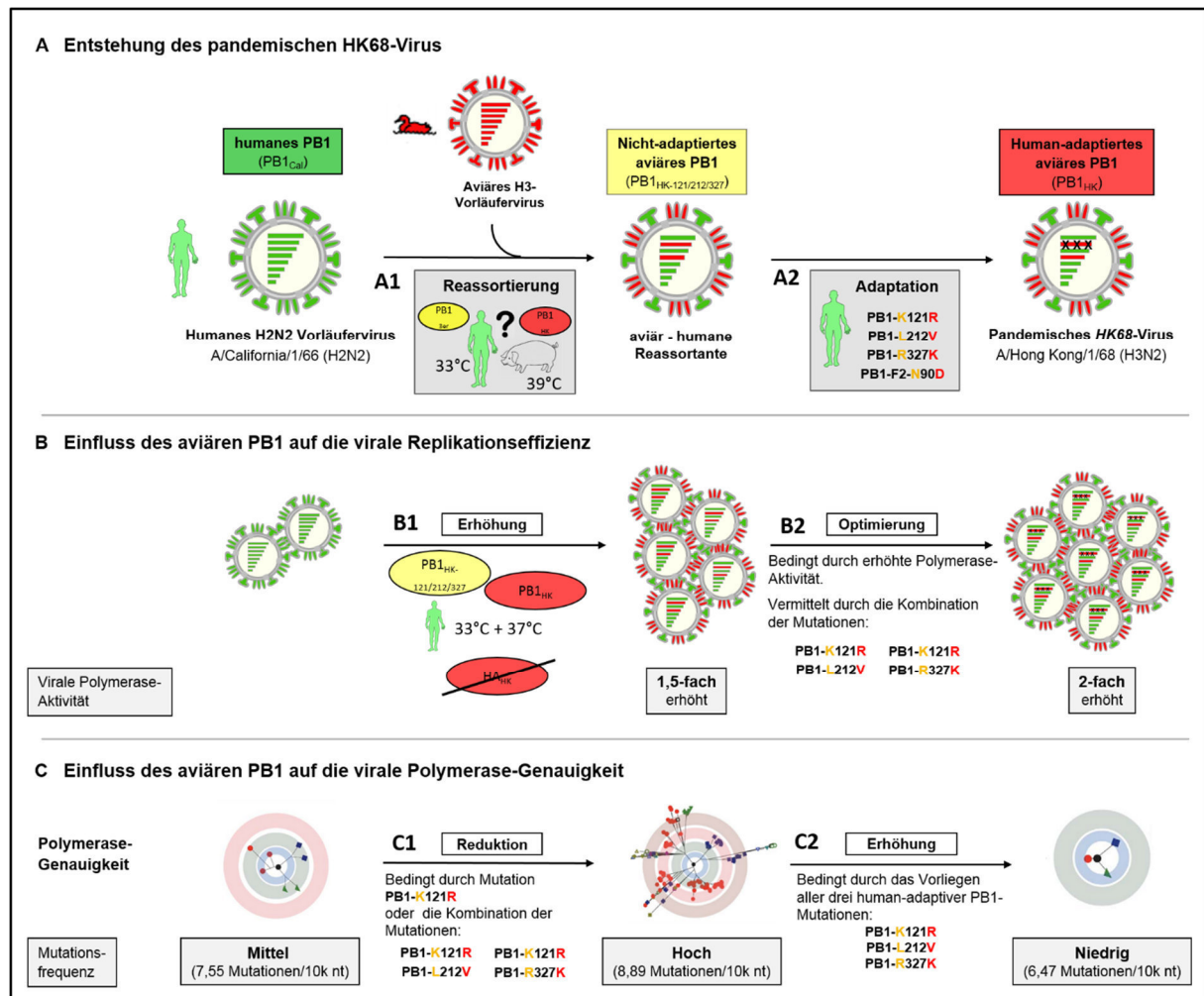


Abb. V.2: Modell zur Entstehung der Pandemie von 1968. In der vorliegenden Arbeit wurde die Entstehung des pandemischen HK68-Virus ausgehend von dem humanen H2N2 Vorläufervirus remodelliert (A), um die biologische Signifikanz des aviären PB1 bei der Entstehung pandemischer Influenza-Viren zu bestimmen. Zusammenfassend dargestellt sind die in dieser Arbeit erzielten Daten bezüglich des Einflusses des aviären PB1 auf die virale Replikationseffizienz (B) und die Polymerase-Genauigkeit (C). Weitere Details bezüglich dieser Abbildung sind dem Text in Abschnitt V.5 zu entnehmen.

Zusammenfassend konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit erstmals für ein pandemisches Influenza-Virus gezeigt werden, dass neben dem Erwerb eines aviären HA-Gensegments, ebenfalls der Reassortierung eines aviären PB1-Gensegments eine biologisch signifikante Rolle bei der Entstehung pandemischer Influenza-Viren zukommt. Diesbezüglich konnte mittels Remodellierung der Pandemie von 1968 beobachtet werden, dass das aviäre PB1 durch zwei Mechanismen zur Entstehung pandemischer Viren beitragen kann:

Zum einen kann die Reassortierung eines aviären PB1 in ein humanes Virus dessen Replikations- und Übertragungseffizienz erhöhen und damit wesentlich zur pandemischen Ausbreitung von Influenza-Viren beitragen.

Und zum anderen kann das Einbringen eines aviären PB1 in einen humanen Polymerasekomplex dessen Polymerase-Genauigkeit zeitweilig herabzusetzen. Dies ermöglicht den neu reassortierten Viren eine genetisch diverse Viruspopulation auszubilden und damit einhergehend sich schnell an die neue Säugetierspezies bzw. den Menschen zu adaptieren.

Dementsprechend trägt neben dem aviären HA, das auf Grund seiner neuen antigenen Eigenschaften den Viren ermöglicht der menschlichen Immunantwort zu entgehen, ebenfalls das aviäre PB1 durch eine erhöhte virale Replikationseffizienz und Übertragbarkeit, sowie durch eine reduzierte Polymerase-Genauigkeit zum pandemischen Potential von neu reassortierten Influenza-Viren bei.

VI. Literaturverzeichnis

- Abed, Y., Pizzorno, A., Hamelin, M.-E., Leung, A., Joubert, P., Couture, C., Kobasa, D. & Boivin, G. (2011).** The 2009 pandemic H1N1 D222G hemagglutinin mutation alters receptor specificity and increases virulence in mice but not in ferrets. *The Journal of Infectious Diseases*, 204(7), pp.1008–1016.
- Air, G. M. (2012).** Influenza neuraminidase. *Influenza and Other Respiratory Viruses*, 6(4), pp.245–256.
- Alymova, I. V, Green, A. M., van de Velde, N., McAuley, J. L., Boyd, K. L., Ghoneim, H. E. & McCullers, J. A. (2011).** Immunopathogenic and antibacterial effects of H3N2 influenza A virus PB1-F2 map to amino acid residues 62, 75, 79, and 82. *Journal of Virology*, 85(23), pp.12324–12333.
- Alymova, I. V, Samarasinghe, A., Vogel, P., Green, A. M., Weinlich, R. & McCullers, J. A. (2014).** A Novel Cytotoxic Sequence Contributes to Influenza A Viral Protein PB1-F2 Pathogenicity and Predisposition to Secondary Bacterial Infection. *Journal of Virology*, 88(1), pp.503–515.
- Anhlan, D., Grundmann, N., Makalowski, W., Ludwig, S. & Scholtissek, C. (2011).** Origin of the 1918 pandemic H1N1 influenza A virus as studied by codon usage patterns and phylogenetic analysis. *RNA*, 17, pp.64–73.
- Area, E., Martín-Benito, J., Gastaminza, P., Torreira, E., Valpuesta, J. M., Carrascosa, J. L. & Ortín, J. (2004).** 3D structure of the influenza virus polymerase complex: localization of subunit domains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(1), pp.308–313.
- Asano, Y., Mizumoto, K., Maruyama, T. & Ishihama, A. (1995).** Photoaffinity Labeling of Influenza Virus RNA Polymerase PB1 Subunit with 8-Azido GTP. *J. Biochem*, 117(3), pp.677–682.
- Bae, S. H., Cheong, H. K., Lee, J. H., Cheong, C., Kainosho, M. & Choi, B. S. (2001).** Structural features of an influenza virus promoter and their implications for viral RNA synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(19), pp.10602–10607.
- Barik, S. (2012).** New treatments for influenza. *BMC Medicine*, 10, p.104
- Belicha-Villanueva, A., Rodriguez-Madoz, J. R., Maamary, J., Baum, A., Bernal-Rubio, D., Minguito de la Escalera, M., Fernandez-Sesma, A. & García-Sastre, A. (2012).** Recombinant influenza A viruses with enhanced levels of PB1 and PA viral protein expression. *Journal of Virology*, 86(10), pp.5926–5930.
- Binh, T.A., Wakai, C., Kawaguchi, A. & Nagata, K. (2014).** Involvement of the N-terminal portion of influenza virus RNA polymerase subunit PB1 in nucleotide recognition. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 443, pp.975–979.
- Belser, J. A, Jayaraman, A., Raman, R., Pappas, C., Zeng, H., Cox, N. J., Katz, J. M., Sasisekharan, R. & Tumpey, T. M. (2011).** Effect of D222G mutation in the hemagglutinin protein on receptor binding, pathogenesis and transmissibility of the 2009 pandemic H1N1 influenza virus. *PLoS One*, 6(9), p.e25091.
- Biswas, S. K. & Nayak, D. P. (1994).** Mutational Analysis of the Conserved Motifs of Influenza A Virus Polymerase Basic Protein 1. *Journal of Virology*, 68(3), pp.1819–1826.
- Boivin, S. & Hart, D. J. (2011).** Interaction of the influenza A virus polymerase PB2 C-terminal region with importin alpha isoforms provides insights into host adaptation and polymerase assembly. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(12), pp.10439–10448.

- Böttcher, E., Matrosovich, T., Beyerle, M., Klenk, H.-D., Garten, W. & Matrosovich, M. (2006).** Proteolytic activation of influenza viruses by serine proteases TMPRSS2 and HAT from human airway epithelium. *Journal of Virology*, 80(19), pp.9896–9898.
- Böttcher-Friebertshäuser, E., Klenk, H.-D. & Garten, W. (2013).** Activation of influenza viruses by proteases from host cells and bacteria in the human airway epithelium. *Pathogens and Disease*, 69(2), pp.87–100.
- Bradley, E. (1979).** Bootstrap Methods: Another Look at the Jackknife. *The Annals of Statistics*, 7(1), pp. 1–26.
- Brown, E. G., Liu, H., Kit, L. C., Baird, S., & Nesrallah, M. (2001).** Pattern of mutation in the genome of influenza A virus on adaptation to increased virulence in the mouse lung : Identification of functional themes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(12), 6883–6888.
- Bussey, K. A., Bousse, T. L., Desmet, E. A., Kim, B. & Takimoto, T. (2010).** PB2 residue 271 plays a key role in enhanced polymerase activity of influenza A viruses in mammalian host cells. *Journal of Virology*, 84(9), pp.4395–4406.
- Calder, L. J., Wasilewski, S., Berriman, J. A. & Rosenthal, P. B. (2010).** Structural organization of a filamentous influenza A virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(23), pp.10685–10690.
- Chakrabarti, A. K. & Pasricha, G. (2013).** An insight into the PB1-F2 protein and its multifunctional role in enhancing the pathogenicity of the influenza A viruses. *Virology*, 440(2), pp.97–104.
- Chanturiya, A. N., Basañez, G., Schubert, U., Henklein, P., Yewdell, W. & Zimmerberg, J. (2004).** PB1-F2 , an Influenza A Virus-Encoded Proapoptotic Mitochondrial Protein , Creates Variably Sized Pores in Planar Lipid Membranes. *Journal of Virology*, 78(12), pp.6304–6312.
- Chen, W., Calvo, P. A., Malide, D., Gibbs, J., Schubert, U., Bacik, I., Basta, S., O'Neill, R., Schickli, J., Palese, P., Henklein, P., Bennink, J.R. & Yewdell, J. W. (2001).** A novel influenza A virus mitochondrial protein that induces cell death. *Nature Medicine*, 7(12), pp. 1306–1312.
- Chen, G.-W., Chang, S.-C., Mok, C., Lo, Y.-L., Kung, Y.-N., Huang, J.-H., Shih, Y.-H., Wang, J.-Y., Chiang, C., Chen, C.-J. & Shih, S.-R. (2006).** Genomic signatures of human versus avian influenza A viruses. *Emerging Infectious Diseases*, 12(9), pp.1353–1360.
- Chen, L.-M., Davis, C. T., Zhou, H., Cox, N. J. & Donis, R. O. (2008).** Genetic compatibility and virulence of reassortants derived from contemporary avian H5N1 and human H3N2 influenza A viruses. *PLoS Pathogens*, 4(5), p.e1000072.
- Chen, C.-J., Chen, G.-W., Wang, C.-H., Huang, C.-H., Wang, Y.-C. & Shih, S.-R. (2010).** Differential localization and function of PB1-F2 derived from different strains of influenza A virus. *Journal of Virology*, 84(19), pp.10051–10062.
- Chou, Y., Vafabakhsh, R., Doğanay, S., Gao, Q., Ha, T. & Palese, P. (2012).** One influenza virus particle packages eight unique viral RNAs as shown by FISH analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(23), pp.9101–9106.
- Chutinimitkul, S., Herfst, S., Steel, J., Lowen, A. C., Ye, J., van Riel, D., Schrauwen, E. J. A., Bestebroer, T. M., Koel, B., Burke, D. F., Sutherland-Cash, K.H., Whittleston, C. S., Russell, C. A., Wales, D. J., Smith, D. J., Jonges, M., Meijer, A., Koopmans, M., Rimmelzwaan, G. F., Kuiken, T., Osterhaus, A. D. M. E., Garcia-Sastre, A., Perez, D. R. & Fouchier, R. A. M. (2010).** Virulence-associated substitution D222G in the hemagglutinin of 2009 pandemic influenza A(H1N1) virus affects receptor binding. *Journal of Virology*, 84(22), pp.11802–10813.
- Cobbin, J. C. a, Verity, E. E., Gilbertson, B. P., Rockman, S. P. & Brown, L. E. (2013).** The source of the PB1 gene in influenza vaccine reassortants selectively alters the hemagglutinin content of the resulting seed virus. *Journal of Virology*, 87(10), pp.5577–5585.

- Coleman, J. R. (2007).** The PB1-F2 protein of Influenza A virus: increasing pathogenicity by disrupting alveolar macrophages. *Virology Journal*, 4, 9.
- Conenello, G. M., Zamarin, D., Perrone, L. A., Tumpey, T. & Palese, P. (2007).** A single mutation in the PB1-F2 of H5N1 (HK/97) and 1918 influenza A viruses contributes to increased virulence. *PLoS Pathogens*, 3(10), pp.1414–1421.
- Conenello, G. M., Tisoncik, J. R., Rosenzweig, E., Varga, Z. T., Palese, P. & Katze, M. G. (2011).** A single N66S mutation in the PB1-F2 protein of influenza A virus increases virulence by inhibiting the early interferon response in vivo. *Journal of Virology*, 85(2), pp.652–662.
- Connor, R. J., Kawaoka, Y., Webster, R. G. & Paulson, J. C. (1994).** Receptor specificity in human, avian, and equine H2 and H3 influenza virus isolates. *Virology*, 205, pp.17–23.
- Cox, N. J. & Subbarao, K. (2000).** Global epidemiology of influenza: past and present. *Annual Review of Medicine*, 51, pp.407–421.
- Cox, N. J., Neumann, G., Donis, R. O. & Kawaoka, Y. (2004).** Orthomyxoviruses: influenza. *Eras*.
- Das, K. (2012).** Antivirals Targeting Influenza A Virus. *Journal of Medicinal Chemistry*, 55, pp.6263–6277.
- De Jong, M. D., Simmons, C. P., Thanh, T. T., Hien, V. M., Smith, G. J. D., Chau, T. N. B., Hoang, D. M., Chau, N. V. V., Khanh, T. H., Dong, V. C., Qui, P. T., Cam, B. V., Ha, D. Q., Guan, Y., Peiris, J. S. M., Chinh, N. T., Hien, T. T. & Farrar, J. (2006).** Fatal outcome of human influenza A (H5N1) is associated with high viral load and hypercytokinemia. *Nature Medicine*, 12(10), pp.1203–7.
- De la Luna, S., Martínez, C. & Ortín, J. (1989).** Molecular cloning and sequencing of influenza virus A/Victoria/3/75 polymerase genes: sequence evolution and prediction of possible functional domains. *Virus Research*, 13(2), pp.143–155.
- De Wit, E., Spronken, M. I. J., Bestebroer, T. M., Rimmelzwaan, G. F., Osterhaus, A. D. M. E. & Fouchier, R. a M. (2004).** Efficient generation and growth of influenza virus A/PR/8/34 from eight cDNA fragments. *Virus Research*, 103(1-2), pp.155–161.
- De Wit, E., Bestebroer, T. M., Spronken, M. I. J., Rimmelzwaan, G. F., Osterhaus, A. D. M. E. & Fouchier, R. a M. (2007).** Rapid sequencing of the non-coding regions of influenza A virus. *Journal of Virological Methods*, 139(1), pp.85–89.
- Desselberger, U., Racaniello, V. R., Zazra, J. J. & Palese, P. (1980).** The 3' and 5'-terminal sequences of influenza A, B and C virus RNA segments are highly conserved and show partial inverted complementarity. *Gene*, 8, pp.315–328.
- Dias, A., Bouvier, D., Crépin, T., McCarthy, A. a, Hart, D. J., Baudin, F., Cusack, S. & Ruigrok, R. W. H. (2009).** The cap-snatching endonuclease of influenza virus polymerase resides in the PA subunit. *Nature*, 458(7240), pp.914–918.
- Digard, P., Blok, V. C. & Inglis, S. C. (1989).** Complex formation between influenza virus polymerase proteins expressed in *Xenopus* oocytes. *Virology*, 171(1), pp.162–169.
- Downie, J. C. (2004).** Reassortment of influenza A virus genes linked to PB1 polymerase gene. *International Congress Series*, 1263, pp.714–718.
- Essere, B., Yver, M., Gavazzi, C., Terrier, O., Isel, C., Fournier, E., Giroux, F., Textoris, J., Julien, T., Socratous, C., Rosa-Calatrava, M., Lina, B., Marquet, R. & Moules, V. (2013).** Critical role of segment-specific packaging signals in genetic reassortment of influenza A viruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(40), p.E3840–8.
- Fechter, P., Mingay, L., Sharps, J., Chambers, A., Fodor, E. & Brownlee, G. G. (2003).** Two aromatic residues in the PB2 subunit of influenza A RNA polymerase are crucial for cap binding. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(22), pp.20381–20388.

- Flick, R. & Hobom, G. (1999).** Interaction of influenza virus polymerase with viral RNA in the “corkscrew” conformation. *The Journal of General Virology*, 80, pp.2565–2572.
- Fodor, E., Palese, P., Brownlee, G. G. & García-Sastre, A. (1998).** Attenuation of Influenza A Virus mRNA Levels by Promoter Mutations. *Journal of Virology*, 72(8), pp.6283–6290.
- Fodor, E. (2013).** The RNA polymerase of influenza A virus: mechanisms of viral transcription and replication. *Acta Virologica*, 57, pp.113–122.
- Fouchier, R. A. M., Munster, V., Wallensten, A., Bestebroer, T. M., Herfst, S., Smith, D., Rimmelzwaan, G. F., Olsen, B. & Osterhaus, A. D. M. E. (2005).** Characterization of a Novel Influenza A Virus Hemagglutinin Subtype (H16) Obtained from Black-Headed Gulls. *Journal of Virology*, 79(5), pp.2814–2833.
- Fournier, E., Moules, V., Essere, B., Paillart, J.-C., Sirbat, J.-D., Isel, C., Cavalier, A., Rolland, J. P., Thomas, D., Lina, B. & Marquet, R. (2012a).** A supramolecular assembly formed by influenza A virus genomic RNA segments. *Nucleic Acids Research*, 40(5), pp.2197–2209.
- Fournier, E., Moules, V., Essere, B., Paillart, J.-C., Sirbat, J.-D., Cavalier, A., Rolland, J. P., Thomas, D., Lina, B., Isel, C. & Marquet, R. (2012b).** Interaction network linking the human H3N2 influenza A virus genomic RNA segments. *Vaccine*, 30(51), pp.7359–7367.
- Fulvini, A. a, Ramanunnair, M., Le, J., Pokorny, B. a, Arroyo, J. M., Silverman, J., Devis, R. & Bucher, D. (2011).** Gene constellation of influenza A virus reassortants with high growth phenotype prepared as seed candidates for vaccine production. *PloS One*, 6(6), p.e20823.
- Gabriel, G., Dauber, B., Wolff, T., Planz, O., Klenk, H.-D. & Stech, J. (2005).** The viral polymerase mediates adaptation of an avian influenza virus to a mammalian host. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(51), pp.18590–18595.
- Gabriel, G., Herwig, A. & Klenk, H.-D. (2008).** Interaction of polymerase subunit PB2 and NP with importin alpha1 is a determinant of host range of influenza A virus. *PLoS Pathogens*, 4(2).
- Gabriel, G., Klingel, K., Otte, A., Thiele, S., Hudjetz, B., Arman-Kalcek, G., Sauter, M., Schmidt, T., Rother, F., Baumgarte, S., Keiner, B., Hartmann, E., Bader, M., Brownlee, G. G., Fodor, E. & Klenk, H.-D. (2011).** Differential use of importin- α isoforms governs cell tropism and host adaptation of influenza virus. *Nature Communications*, 2, 156.
- Gabriel, G., Czudai-Matwich, V. & Klenk, H.-D. (2013).** Adaptive mutations in the H5N1 polymerase complex. *Virus Research*, 178(1), pp.53–62.
- Galloway, S. E., Reed, M. L., Russell, C. J. & Steinhauer, D. A. (2013).** Influenza HA subtypes demonstrate divergent phenotypes for cleavage activation and pH of fusion: implications for host range and adaptation. *PLoS Pathogens*, 9(2), p.e1003151.
- Gammel, M., Altmüller, A., Reinhardt, U., Mandeer, J., Harley, V. R., Hudson, P. J., Fitch, W. M. & Scholtissek, C. (1990).** Phylogenetic Analysis of Nucleoproteins Suggests That Human Influenza A Viruses Emerged from a 19th ~ Century Avian Ancestor '. *Ecology*, 7(2), pp.194–200.
- Gao, R., Cao, B., Hu, Y., Feng, Z., Wang, D., Hu, W., ... Shu, Y. (2013).** Human infection with a novel avian-origin influenza A (H7N9) virus. *The New England Journal of Medicine*, 368(20), pp.1888–1897.
- Garten, R. J., Davis, C. T., Russell, C. A., Shu, B., Lindstrom, S., Balish, A., ... Cox, N. J. (2009).** Antigenic and genetic characteristics of swine-origin 2009 A(H1N1) influenza viruses circulating in humans. *Science*, 325(5937), pp.197–201.
- Garten, W. & Klenk, H. D. (2008).** Cleavage activation of the influenza virus hemagglutinin and its role in pathogenesis. *Monographs in Virology*, 27, pp.156–167.

- Gavazzi, C., Yver, M., Isel, C., Smyth, R. P., Rosa-Calatrava, M., Lina, B., Moules, V. & Marquet, R. (2013).** A functional sequence-specific interaction between influenza A virus genomic RNA segments. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(41), pp.16604–16609.
- Gibbs, J. S., Malide, D., Hornung, F., Bennink, J. R. & Yewdell, J. W. (2003).** The Influenza A Virus PB1-F2 Protein Targets the Inner Mitochondrial Membrane via a Predicted Basic Amphipathic Helix That Disrupts Mitochondrial Function. *Journal of Virology*, 77(13), pp.7214–7224.
- González, S. & Ortín, J. (1999).** Characterization of Influenza Virus PB1 Protein Binding to Viral RNA: Two Separate Regions of the Protein Contribute to the Interaction Domain. *Journal of Virology*, 73(1), pp.631–637.
- González, S. & Ortín, J. (1999).** Distinct regions of influenza virus PB1 polymerase subunit recognize vRNA and cRNA templates. *The EMBO Journal*, 18(13), pp.3767–3775.
- Gorman, O. T., Donis, R. O., Kawaoka, Y. & Webster, R. G. (1990).** Evolution of Influenza A Virus PB2 Genes : Implications for Evolution of the Ribonucleoprotein Complex and Origin of Human Influenza A Virus. *Journal of Virology*, 64(10), pp.4893–4902.
- Gorman, O. T., Bean, W. J., Kawaoka, Y., Donatelli, I., Guo, Y. & Webster, R. G. (1991).** Evolution of influenza A virus nucleoprotein genes : implications for the origins of H1N1 human and classical swine viruses . *Journal of Virology*, 65(7), pp.3704–3714.
- Guilligay, D., Tarendeau, F., Resa-Infante, P., Coloma, R., Crepin, T., Sehr, P., Lewis, J., Ruigrok, R. W. H., Ortín, J., Hart, D. J. & Cusack, S. (2008).** The structural basis for cap binding by influenza virus polymerase subunit PB2. *Nature Structural & Molecular Biology*, 15(5), pp.500–506.
- Hagen, M., Chung, T. D., Butcher, J. A. & Krystal, M. (1994).** Recombinant influenza virus polymerase: requirement of both 5' and 3' viral ends for endonuclease activity. *Journal of Virology*, 68(3), pp.1509–1515.
- Hai, R., Schmolke, M., Varga, Z. T., Manicassamy, B., Wang, T. T., Belser, J. A., Pearce, M. B., Garcia-Sastre, A., Tumpey, T. M. & Palese, P. (2010).** PB1-F2 expression by the 2009 pandemic H1N1 influenza virus has minimal impact on virulence in animal models. *Journal of Virology*, 84(9), pp.4442–4450.
- Hall, T. A. (1999).** BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41, pp.95–98.
- Hatta, M., Hatta, Y., Kim, J. H., Watanabe, S., Shinya, K., Nguyen, T., Lien, P. S., Li, Q. M. & Kawaoka, Y. (2007).** Growth of H5N1 influenza A viruses in the upper respiratory tracts of mice. *PLoS Pathogens*, 3(10), pp.1374–1379.
- He, X., Zhou, J., Bartlam, M., Zhang, R., Ma, J., Lou, Z., Li, X., Li, J., Joachimiak, A., Zeng, Z., Ge, R., Rao, Z. & Liu, Y. (2008).** Crystal structure of the polymerase PA(C)-PB1(N) complex from an avian influenza H5N1 virus. *Nature*, 454(7208), pp.1123–1126.
- Hemerka, J. N., Wang, D., Weng, Y., Lu, W., Kaushik, R. S., Jin, J., Harmon, A. F. & Li, F. (2009).** Detection and characterization of influenza A virus PA-PB2 interaction through a bimolecular fluorescence complementation assay. *Journal of Virology*, 83(8), pp.3944–3955.
- Henkel, M., Mitzner, D., Henklein, P., Meyer-Almes, F.-J., Moroni, A., Difrancesco, M. L., Henkes, L. M., Kreim, M., Kast, S. M., Schubert, U. & Thiel, G. (2010).** The proapoptotic influenza A virus protein PB1-F2 forms a nonselective ion channel. *PLoS One*, 5(6), p.e11112.
- Herfst, S., Schrauwen, E. J. a., Linster, M., Chutinimitkul, S., de Wit, E., Munster, V. J., Sorrell, E. M., Bestebroer, T. M., Burke, D. F., Smith, D. J., Rimmelzwaan, G. F., Osterhaus, A. D. M. E. & Fouchier, R. A. M. (2012).** Airborne Transmission of Influenza A/H5N1 Virus Between Ferrets. *Science*, 336(6088), pp.1534–1541.

- Herrler, G. & Klenk, H.D. (1991). Structure and function of the HEF glycoprotein of influenza C virus. *Adv Virus Res*, 40, pp.213–234.
- Hoffmann, E., Neumann, G., Kawaoka, Y., Hobom, G. & Webster, R. G. (2000). A DNA transfection system for generation of influenza A virus from eight plasmids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(11), pp.6108–6113.
- Hoffmann, E., Stech, J., Guan, Y., Webster, R. G. & Perez, D. R. (2001). Universal primer set for the full-length amplification of all influenza A viruses. *Archives of Virology*, 146(12), pp.2275–2289.
- Horimoto, T. & Kawaoka, Y. (2005). Influenza: lessons from past pandemics, warnings from current incidents. *Nature Reviews. Microbiology*, 3(8), pp.591–600.
- Hudjetz, B. & Gabriel, G. (2012). Human-like PB2 627K influenza virus polymerase activity is regulated by importin- α 1 and - α 7. *PLoS Pathogens*, 8(1).
- Hutchinson, E. C., Wise, H. M., Kudryavtseva, K., Curran, M. D. & Digard, P. (2009). Characterisation of influenza A viruses with mutations in segment 5 packaging signals. *Vaccine*, 27(45), pp.6270–6275.
- Hutchinson, E. C., von Kirchbach, J. C., Gog, J. R. & Digard, P. (2010). Genome packaging in influenza A virus. *The Journal of General Virology*, 91(Pt 2), pp.313–328.
- Hutchinson, E. C. & Fodor, E. (2012). Nuclear import of the influenza A virus transcriptional machinery. *Vaccine*, 30(51), pp.7353–7358.
- Hutchinson, E. C. & Fodor, E. (2013). Transport of the influenza virus genome from nucleus to nucleus. *Viruses*, 5(10), pp.2424–2446.
- Imai, M., Watanabe, T., Hatta, M., Das, S. C., Ozawa, M., Shinya, K., Zhong, G., Hanson, A., Katsura, H., Watanabe, S., Li, C., Kawakami, E., Yamada, S., Kiso, M., Suzuki, Y., Maher, E. A., Neumann, G. & Kawaoka, Y. (2012). Experimental adaptation of an influenza H5 HA confers respiratory droplet transmission to a reassortant H5 HA/H1N1 virus in ferrets. *Nature*.
- Imai, M., Herfst, S., Sorrell, E. M., Schrauwen, E. J. a, Linster, M., De Graaf, M., Fouchier, R. A. M. & Kawaoka, Y. (2013). Transmission of influenza A/H5N1 viruses in mammals. *Virus Research*, 178(1), pp.15–20.
- Isakov, O., Borderia, A. V., Golan, D., Hamenahem, A., Celniker, G., Yotte, L., Blanc, H., Vignuzzi, M. & Shomron, M. (2014). Deep sequencing analysis of viral infection and evolution allows rapid and detailed characterization of viral mutant spectrum. *unpublished*
- Ison, M. G. (2011). Antivirals and resistance: Influenza virus. *Current Opinion in Virology*, 1, pp.563–573.
- Jagger, B. W., Wise, H. M., Kash, J. C., Walters, K., Wills, N. M., Xiao, Y.-L., Dunfee, R. L., Schwartzman, L. M., Ozinsky, A., Bell, G. L., Dalton, R. M., Lo, A., Efstathiou, S., Atkins, J. F., Firth, A. E., Taubenberger, J. K. & Digard, P. (2012). An overlapping protein-coding region in influenza A virus segment 3 modulates the host response. *Science*, 337(6091), pp.199–204.
- Jiang, H., Zhang, S., Wang, Q., Wang, J., Geng, L. & Toyoda, T. (2010). Influenza virus genome C4 promoter/origin attenuates its transcription and replication activity by the low polymerase recognition activity. *Virology*, 408(2), pp.190–196.
- Jung, T. E. & Brownlee, G. G. (2006). A new promoter-binding site in the PB1 subunit of the influenza A virus polymerase. *The Journal of General Virology*, 87(Pt 3), pp.679–688.
- Kang, S., Yang, I. S., Lee, J.-Y., Park, Y., Oh, H.-B., Kang, C. & Kim, K. H. (2010). Epidemiologic study of human influenza virus infection in South Korea from 1999 to 2007: origin and evolution of A/Fujian/411/2002-like strains. *Journal of Clinical Microbiology*, 48(6), pp.2177–2185.
- Kates, M., Allison, A. C., Tyrell, D. A. & James, A. T. (1962). Origin of lipids in influenza virus. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 27, pp.293–301.

- Karasin, A. L., Schutten, M. M., Cooper, L. A., Smith, C. B., Subbarao, K., Anderson, G. A., Carman, S. & Olsen, C. W. (2000). Genetic characterization of H3N2 influenza viruses isolated from pigs in North America, 1977-1999: evidence for wholly human and reassortant virus genotypes. *Virus Research*, 68(1), pp.71–85.
- Kawaoka, Y., Krauss, S. & Webster, R. G. (1989). Avian-to-human transmission of the PB1 gene of influenza A viruses in the 1957 and 1968 pandemics. *Journal of Virology*, 63(11), pp.4603–4608.
- Khiabian, H., Trifonov, V. & Rabadan, R. (2009). Reassortment patterns in Swine influenza viruses. *PloS One*, 4(10), p.e7366.
- Kilbourne, E. D., Smith, C., Brett, I., Pokorny, B. A., Johansson, B. & Cox, N. J. (2002). The total influenza vaccine failure of 1947 revisited: Major intrasubtypic antigenic change can explain failure of vaccine in a post-World War II epidemic. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(16), pp.10748–10752.
- Kilbourne, E. D. (2006). Influenza Pandemics of the 20th Century. *Emerging Infectious Diseases*, 12(1), pp.9–14.
- Klenk, H. D., Rott, R., Orlich, M. & Blödorn, J. (1975). Activation of influenza A viruses by trypsin treatment. *Virology*, 68(2), pp.426–439.
- Klenk, H. D. & Garten, W. (1994). Host cell proteases controlling virus pathogenicity. *Trends in Microbiology*, 2(2), pp.39–43.
- Klenk, H. (2005). Infection of the endothelium by influenza viruses. *Schattauer GmbH*, pp.262–265.
- Klenk, H. D., Garten, W., & Matrosovich, M. (2011). Molecular mechanisms of interspecies transmission and pathogenicity of influenza viruses: Lessons from the 2009 pandemic. *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, 33(3), pp.180–188.
- Klenk, H. D. (2013). Evolution and infection biology of new influenza A viruses with pandemic potential. *Bundesgesundheitsblatt, Gesundheitsforschung, Gesundheitsschutz*, 56(1), pp.15–21.
- Kobasa, D., Takada, A., Shinya, K., Hatta, M., Halfmann, P., Theriault, S., Suzuki, H., Nishimura, H., Mitamura, K., Sugaya, N., Usui, T., Murata, T., Maeda, Y., Watanabe, S., Suresh, M., Suzuki, T., Suzuki, Y., Feldmann, H. & Kawaoka, Y. (2004). Enhanced virulence of influenza A viruses with the haemagglutinin of the 1918 pandemic virus. *Nature*, 431, pp.703–707.
- Kolpashchikov, D. M., Honda, A. & Ishihama, A. (2004). Structure-function relationship of the influenza virus RNA polymerase: primer-binding site on the PB1 subunit. *Biochemistry*, 43(19), pp.5882–5887.
- Košík, I., Hollý, J. & Russ, G. (2013). PB1-F2 expedition from the whole protein through the domain to aa residue function. *Acta Virologica*, 1997, pp.138–148.
- Kuzuhara, T., Kise, D., Yoshida, H., Horita, T., Murazaki, Y., Nishimura, A., Echigo, N., Utsunomiya, H. & Tsuge, H. (2009). Structural basis of the influenza A virus RNA polymerase PB2 RNA-binding domain containing the pathogenicity-determinant lysine 627 residue. *The Journal of Biological Chemistry*, 284(11), pp.6855–6860.
- Labadie, K., Dos Santos Afonso, E., Rameix-Welti, M.-A., van der Werf, S. & Naffakh, N. (2007). Host-range determinants on the PB2 protein of influenza A viruses control the interaction between the viral polymerase and nucleoprotein in human cells. *Virology*, 362(2), pp.271–282.
- Leahy, M. B., Dessens, J. T., Weber, F., Kochs, G. & Nuttall, P. A. (1997). The fourth genus in the Orthomyxoviridae: Sequence analyses of two Thogoto virus polymerase proteins and comparison with influenza viruses. *Virus Research*, 50(2), pp.215–224.

- Lee, K. H. & Seong, B. L. (1998).** The position 4 nucleotide at the 3' end of the influenza virus neuraminidase vRNA is involved in temporal regulation of transcription and replication of neuraminidase RNAs and affects the repertoire of influenza virus surface antigens. *The Journal of General Virology*, 79 (Pt 8), pp.1923–1934.
- Lee, M.-K., Bae, S.-H., Park, C.-J., Cheong, H.-K., Cheong, C. & Choi, B.-S. (2003).** A single-nucleotide natural variation (U4 to C4) in an influenza A virus promoter exhibits a large structural change: implications for differential viral RNA synthesis by RNA-dependent RNA polymerase. *Nucleic Acids Research*, 31(4), pp.1216–1223.
- Lee, S. M. Y. & Yen, H. L. (2012).** Targeting the host or the virus: Current and novel concepts for antiviral approaches against influenza virus infection. *Antiviral Research*.
- Li, M. L., Ramirez, B. C. & Krug, R. M. (1998).** RNA-dependent activation of primer RNA production by influenza virus polymerase: different regions of the same protein subunit constitute the two required RNA-binding sites. *The EMBO Journal*, 17(19), pp.5844–5852.
- Li, O. T. W., Chan, M. C. W., Leung, C. S. W., Chan, R. W. Y., Guan, Y., Nicholls, J. M. & Poon, L. L. M. (2009).** Full factorial analysis of mammalian and avian influenza polymerase subunits suggests a role of an efficient polymerase for virus adaptation. *PloS One*, 4(5), p.e5658.
- Lindstrom, S. E., Cox, N. J. & Klimov, A. (2004).** Genetic analysis of human H2N2 and early H3N2 influenza viruses, 1957-1972: evidence for genetic divergence and multiple reassortment events. *Virology*, 328(1), pp.101–119.
- Linster, M., Van Boheemen, S., De Grraf, M., Schrauwen, E. J., Lexmond, P., Mänz, B., Bestebroer, T. M., Baumann, J., Van Riel, D., Rimmelzwaan, G. F., Osterhaus, A. D. M. E., Matrosovich, M., Fouchier, R. A. M. & Herfst, S. (2014).** Identification, characterization and natural selection of mutations driving airborne transmission of A/H5N1 Virus. *Cell*, 157, pp.329–339.
- Liu, Y., Childs, R. A., Matrosovich, T., Wharton, S., Palma, A. S., Chai, W., Daniels, R., Gregory, V., Uhlenendorff, J., Kiso, M., Klenk, H. D., Hay, A., Feizi, T. & Matrosovich, M. (2010).** Altered receptor specificity and cell tropism of D222G hemagglutinin mutants isolated from fatal cases of pandemic A(H1N1) 2009 influenza virus. *Journal of Virology*, 84(22), pp.12069–12074.
- Lowen, A. C., Mubareka, S., Tumpey, T. M., García-Sastre, A. & Palese, P. (2006).** The guinea pig as a transmission model for human influenza viruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(26), pp.9988–9992.
- Ludwig, S., Stitz, L., Planz, O., Van, H., Fitch, W. M. & Scholtissek, C. (1995).** European swine virus as a possible source for the next influenza pandemic. *Virology*, 212, pp.555–561.
- Mansky, L. M. & Cunningham, K. S. (2000).** Virus mutators and antimutators. *Trends in Genetics*, 16(11), pp.512–517.
- Mänz, B., Brunotte, L., Reuther, P. & Schwemmle, M. (2012).** Adaptive mutations in NEP compensate for defective H5N1 RNA replication in cultured human cells. *Nature Communications*.
- Mänz, B., Schwemmle, M. & Brunotte, L. (2013).** Adaptation of avian influenza A virus polymerase in mammals to overcome the host species barrier. *Journal of Virology*, 87(13), pp.7200–7209.
- Marsh, G. A., Hatami, R. & Palese, P. (2007).** Specific residues of the influenza A virus hemagglutinin viral RNA are important for efficient packaging into budding virions. *Journal of Virology*, 81(18), pp.9727–9736.
- Massin, P., Van Der Werf, S. & Naffakh, N. (2001).** Residue 627 of PB2 Is a Determinant of Cold Sensitivity in RNA Replication of Avian Influenza Viruses. *Society*, 75(11), pp.5398–5404.

- Matrosovich, M. N., Gambaryan, A. S., Teneberg, S., Piskarev, V. E., Yamnikova, S. S., Lvov, D. K., Robertson, S. & Karlsson, K. A. (1997).** Avian influenza A viruses differ from human viruses by recognition of sialyloligosaccharides and gangliosides and by a higher conservation of the HA receptor-binding site. *Virology*, 233(1), pp.224–234.
- Matrosovich, M., Tuzikov, A., Bovin, N., Gambaryan, A., Klimov, A., Castrucci, M. R., Donatelli, I. & Kawaoka, Y. (2000).** Early alterations of the receptor-binding properties of H1, H2, and H3 avian influenza virus hemagglutinins after their introduction into mammals. *Journal of Virology*, 74(18), pp.8502–8512.
- Matrosovich, M. N., Matrosovich, T. Y., Gray, T., Roberts, N. A. & Klenk, H.-D. (2004).** Human and avian influenza viruses target different cell types in cultures of human airway epithelium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(13), pp.4620–4624.
- Mazur, I., Anhlan, D., Mitzner, D., Wixler, L., Schubert, U. & Ludwig, S. (2008).** The proapoptotic influenza A virus protein PB1-F2 regulates viral polymerase activity by interaction with the PB1 protein. *Cellular Microbiology*, 10(5), pp.1140–1152.
- McAuley, J. L., Hornung, F., Boyd, K. L., Smith, A. M., McKeon, R., Bennink, J., Yewdell, J. W. & McCullers, J. A. (2007).** Expression of the 1918 influenza A virus PB1-F2 enhances the pathogenesis of viral and secondary bacterial pneumonia. *Cell Host & Microbe*, 2(4), pp.240–249.
- McAuley, J. L., Zhang, K. & McCullers, J. A. (2010a).** The effects of influenza A virus PB1-F2 protein on polymerase activity are strain specific and do not impact pathogenesis. *Journal of Virology*, 84(1), pp.558–564.
- McAuley, J. L., Chipuk, J. E., Boyd, K. L., Van De Velde, N., Green, D. R. & McCullers, J. A. (2010b).** PB1-F2 proteins from H5N1 and 20 century pandemic influenza viruses cause immunopathology. *PLoS Pathogens*, 6(7), p.e1001014.
- Mehle, A. & Doudna, J. A. (2008).** An inhibitory activity in human cells restricts the function of an avian-like influenza virus polymerase. *Cell Host & Microbe*, 4(2), pp.111–122.
- Mehle, A. & Doudna, J. A. (2009).** Adaptive strategies of the influenza virus polymerase for replication in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(50), 21312–21316.
- Mehle, A., Dugan, V. G., Taubenberger, J. K. & Doudna, J. A. (2012).** Reassortment and mutation of the avian influenza virus polymerase PA subunit overcome species barriers. *Journal of Virology*, 86(3), pp.1750–1757.
- Modrow, S., D. Falke und U. Truyen, Eds. (2003).** Molekulare Virologie, Spektrum Akademischer Verlag.
- Morens, D. M., Taubenberger, J. K., & Fauci, A. S. (2009).** The persistent legacy of the 1918 influenza virus. *The New England Journal of Medicine*, 361, pp.225–229.
- Morens, D. M., Taubenberger, J. K., Folkers, G. K. & Fauci, A. S. (2010).** Pandemic influenza's 500th anniversary. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 51(12), pp.1442–1444.
- Morens, D. M., Taubenberger, J. K., Harvey, H. A. & Memoli, M. J. (2010).** The 1918 influenza pandemic: Lessons for 2009 and the future. *Critical Care Medicine*, 38.
- Morens, D. M. & Taubenberger, J. K. (2011).** Pandemic influenza: certain uncertainties. *Reviews in Medical Virology*, 21, pp.262–284.
- Müller, R., Poch, O., Delarue, M., Bishop, D. H. & Bouloy, M. (1994).** Rift Valley fever virus L segment: correction of the sequence and possible functional role of newly identified regions conserved in RNA-dependent polymerases. *The Journal of General Virology*, 75, pp.1345–1352.

- Muramoto, Y., Noda, T., Kawakami, E., Akkina, R. & Kawaoka, Y. (2013).** Identification of novel influenza A virus proteins translated from PA mRNA. *Journal of Virology*, 87(5), pp.2455–2462.
- Naffakh, N., Massin, P., Escriou, N., Crescenzo-Chaigne, B. & van der Werf, S. (2000).** Genetic analysis of the compatibility between polymerase proteins from human and avian strains of influenza A viruses. *The Journal of General Virology*, 81(5), pp.1283–1291.
- Naffakh, N., Tomoiu, A., Rameix-Welti, M.-A. & van der Werf, S. (2008).** Host restriction of avian influenza viruses at the level of the ribonucleoproteins. *Annual Review of Microbiology*, 62, pp.403–424.
- Nath, S.T. & Nayak, D.P. (1990).** Function of two discrete regions is required for nuclear localization of polymerase basic protein 1 of A/WSN/33 Influenza Virus (H1N1). *Molecular and Cellular Biology*, 10(8), pp.4139–4145.
- Neumann, G., Noda, T. & Kawaoka, Y. (2009).** Emergence and pandemic potential of swine-origin H1N1 influenza virus. *Nature*, 459(7249), pp.931–939.
- Nobusawa, E. & Sato, K. (2006).** Comparison of the Mutation Rates of Human Influenza A and B Viruses. *Journal of Virology*, 80(7), pp.3675–3678.
- Noda, T., Sagara, H., Yen, A., Takada, A., Kida, H., Cheng, R. H. & Kawaoka, Y. (2006).** Architecture of ribonucleoprotein complexes in influenza A virus particles. *Nature*, 439(7075), pp.490–492.
- Noda, T., Sugita, Y., Aoyama, K., Hirase, A., Kawakami, E., Miyazawa, A., Sagara, H. & Kawaoka, Y. (2012).** Three-dimensional analysis of ribonucleoprotein complexes in influenza A virus. *Nature Communications*, 3, p.639.
- Obayashi, E., Yoshida, H., Kawai, F., Shibayama, N., Kawaguchi, A., Nagata, K., Tame, J. R. H. & Park, S.-Y. (2008).** The structural basis for an essential subunit interaction in influenza virus RNA polymerase. *Nature*, 454(7208), pp.1127–1131.
- Octaviani, C. P., Goto, H. & Kawaoka, Y. (2011).** Reassortment between seasonal H1N1 and pandemic (H1N1) 2009 influenza viruses is restricted by limited compatibility among polymerase subunits. *Journal of Virology*, 85(16), pp.8449–8452.
- Olsen, B., Munster, V. J., Wallensten, A., Waldenström, J., Osterhaus, A. D. M. E. & Fouchier, R. A. M. (2006).** Global patterns of influenza A virus in wild birds. *Science*, 312(5772), pp.384–388.
- Oxford, J. S. (2000).** Influenza A pandemics of the 20th century with special reference to 1918: Virology, pathology and epidemiology. *Reviews in Medical Virology*, 10, pp.119–133.
- Pappas, C., Aguilar, P. V., Basler, C. F., Solórzano, A., Zeng, H., Perrone, L. A., Palese, P., Garcia-Sastre, A., Katz, J. M. & Tumpey, T. M. (2008).** Single gene reassortants identify a critical role for PB1, HA, and NA in the high virulence of the 1918 pandemic influenza virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(8), pp.3064–3069.
- Pasricha, G., Mishra, A. C. & Chakrabarti, A. K. (2013).** Comprehensive global amino acid sequence analysis of PB1F2 protein of influenza A H5N1 viruses and the influenza A virus subtypes responsible for the 20th-century pandemics. *Influenza and Other Respiratory Viruses*, 7(4), pp.497–505.
- Plant, E.P., Liu, T. M., Xie, H. & Ye, Z. (2012).** Mutations to A/Puerto Rico/8/34 PB1 gene improves seasonal reassortant influenza A virus growth kinetics. *Vaccine*, 31, pp.207–212.
- Poch, O., Sauvaget, I., Delarue, M. & Tordo, N. (1989).** Identification of four conserved motifs among the RNA-dependent polymerase encoding elements. *EMBO Journal*, 8(12), pp.3867–3874.
- Poole, E., Elton, D., Medcalf, L. & Digard, P. (2004).** Functional domains of the influenza A virus PB2 protein: identification of NP- and PB1-binding sites. *Virology*, 321(1), pp.120–133.

- Presti, R. M., Zhao, G., Beatty, W. L., Mihindukulasuriya, K. A., da Rosa, A. P. A. T., Popov, V. L., Tesh, R. B., Virgin, H. W. & Wang, D. (2009).** Quarantil, Johnston Atoll, and Lake Chad viruses are novel members of the family Orthomyxoviridae. *Journal of Virology*, 83(22), pp.11599–11606.
- R Core Team (2014).** R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <http://www.R-project.org/>.
- Ramanunnair, M., Le, J., Onodera, S., Fulvini, A. A., Pokorny, B. A., Silverman, J., Devis, R., Arroyo, J. M., He, Y., Boyne, A., Bera, J., Halpin, R., Hine, E., Spiro, D. J. & Bucher, D. (2013).** Molecular signature of high yield (growth) influenza A virus reassortants prepared as candidate vaccine seeds. *PLoS One*, 8(6), p.e65955.
- Reperant, L. A., Kuiken, T. & Osterhaus, A. D. M. E. (2012).** Adaptive pathways of zoonotic influenza viruses: from exposure to establishment in humans. *Vaccine*, 30(30), pp.4419–4434.
- Resa-Infante, P. & Gabriel, G. (2013).** The nuclear import machinery is a determinant of influenza virus host adaptation. *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, 35(1), pp.23–27.
- Robertson, J. S. (1979).** 5' and 3' terminal nucleotide sequences of the RNA genome segments of influenza virus. *Nucleic Acids Research*, 6(12), pp.3745–3758.
- Rogers, G. N. & Paulson, J. C. (1983).** Receptor determinants of human and animal influenza virus isolates: differences in receptor specificity of the H3 hemagglutinin based on species of origin. *Virology*, 127(2), pp.361–373.
- Romanos, M. A. & Hay, A. J. (1984).** Identification of the Influenza Virus Transcriptase by Affinity-Labeling with Pyridoxal 5'-Phosphate. *Virology*, 132, pp.110–117.
- Rudneva, L. A., Timofeeva, T. A., Shilov, A. A., Kochergin-Nikitsky, K. S., Varich, N. L., Ilyushina, N. A., Gambaryan, A. S., Krylov, P. S. & Kaverin, N. V. (2007).** Effect of gene constellation and postreassortment amino acid change on the phenotypic features of H5 influenza virus reassortants. *Archives of Virology*, 152(6), pp.1139–1145.
- Ruigrok, R. W. H., Crépin, T., Hart, D. J. & Cusack, S. (2010).** Towards an atomic resolution understanding of the influenza virus replication machinery. *Current Opinion in Structural Biology*, 20(1), pp.104–113.
- Schmolke, M., Manicassamy, B., Pena, L., Sutton, T., Hai, R., Varga, Z. T., Hale, B. G., Steel, J., Pérez, D. R. & García-Sastre, A. (2011).** Differential contribution of PB1-F2 to the virulence of highly pathogenic H5N1 influenza A virus in mammalian and avian species. *PLoS Pathogens*, 7(8), p.e1002186.
- Scholtissek, C., Rohde, W., Von Hoyningen, V. & Rott, R. (1978).** On the Origin of the Human Influenza Virus Subtypes H2N2 and H3N2. *Virology*, 87, pp.13–20.
- Scholtissek, C. (1991).** Pigs as mixing-vessels for the creation of new pandemic influenza A viruses. *Medical Principles and Practice*, 2, pp.65–71.
- Scholtissek, C., Ludwig, S. & Fitch, W. M. (1993).** Analysis of influenza A virus nucleoproteins for the assessment of molecular genetic mechanisms leading to new phylogenetic virus lineages. *Archives of Virology*, 131, pp.237–250.
- Schrauwen, E. J. A., de Graaf, M., Herfst, S., Rimmelzwaan, G. F., Osterhaus, A. D. M. E. & Fouchier, R. A. M. (2014).** Determinants of virulence of influenza A virus. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases: Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology*, 33(4), pp.479–490.

- Shelton, H., Roberts, K. L., Molesti, E., Temperton, N. & Barclay, W. S. (2013).** Mutations in haemagglutinin that affect receptor binding and pH stability increase replication of a PR8 influenza virus with H5 HA in the upper respiratory tract of ferrets and may contribute to transmissibility. *The Journal of General Virology*, 94(6), pp.1220–1229.
- Shinya, K., Ebina, M., Yamada, S., Ono, M., Kasai, N. & Kawaoka, Y. (2006).** Avian flu: influenza virus receptors in the human airway. *Nature*, 440(7083), pp.435–436.
- Shinya, K., Watanabe, S., Ito, T., Kasai, N. & Kawaoka, Y. (2007).** Adaptation of an H7N7 equine influenza A virus in mice. *The Journal of General Virology*, 88(2), 547–553.
- Skehel, J. J. & Wiley, D. C. (2000).** Receptor Binding And Membrane Fusion In Virus Entry : The Influenza Hemagglutinin. *Annu. Rev. Biochem.*, 69, pp.531–569.
- Smith, G. J. D., Bahl, J., Vijaykrishna, D., Zhang, J., Poon, L. L. M., Chen, H., Webster, R. G., Peiris, J. S. M. & Guan, Y. (2009).** Dating the emergence of pandemic influenza viruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(28), pp.11709–11712.
- Smith, G. J. D., Vijaykrishna, D., Bahl, J., Lycett, S. J., Worobey, M., Pybus, O. G., Ma, S. K., Cheung, C. L., Raghvani, J., Bhatt, S., Peiris, J. S. M., Guan, Y. & Rambaut, A. (2009).** Origins and evolutionary genomics of the 2009 swine-origin H1N1 influenza A epidemic. *Nature*, 459(7250), pp.1122–1125.
- Sorrell, E. M., Schrauwen, E. J. a, Linster, M., De Graaf, M., Herfst, S. & Fouchier, R. a M. (2011).** Predicting “airborne” influenza viruses: (trans-) mission impossible? *Current Opinion in Virology*, 1(6), pp.635–642.
- Steel, J. & Palese, P. (2008).** The 1918 Influenza Pandemic: Lessons from the Past Raise Questions for the Future. *Monographs in Virology*, 27, pp.272–286.
- Steel, J., Lowen, A. C., Mubareka, S. & Palese, P. (2009).** Transmission of influenza virus in a mammalian host is increased by PB2 amino acids 627K or 627E/701N. *PLoS Pathogens*, 5(1), p.e1000252.
- Steinhauer, D. A. (1999).** Role of Hemagglutinin Cleavage for the Pathogenicity of Influenza Virus. *Virology*, 258, pp.1–20.
- Stich, M., Manrubia, S. C. & Lázaro, E. (2010).** Variable Mutation Rates as an Adaptive Strategy in Replicator Populations. *PloS One*, 5(6).
- Sugiyama, K., Obayashi, E., Kawaguchi, A., Suzuki, Y., Tame, J. R. H., Nagata, K. & Park, S.-Y. (2009).** Structural insight into the essential PB1-PB2 subunit contact of the influenza virus RNA polymerase. *The EMBO Journal*, 28(12), pp.1803–1811.
- Sun, W., Li, J., Han, P., Yang, Y., Kang, X., Li, Y., Li, J., Zhang, Y., Wu, X., Jiang, T., Qin, C., Hu, Y. & Zhu, Q. (2014).** U4 at the 3' UTR of PB1 Segment of H5N1 Influenza Virus Promotes RNA Polymerase Activity and Contributes to Viral Pathogenicity. *PloS One*, 9(3), p.e93366.
- Sun, X., Shi, Y., Lu, X., He, J., Gao, F., Yan, J., Qi, J. & Gao, G. F. (2013).** Bat-derived influenza hemagglutinin H17 does not bind canonical avian or human receptors and most likely uses a unique entry mechanism. *Cell Reports*, 3(3), pp.769–778.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A. & Kumar, S. (2013).** MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30(12), pp.2725–2729.
- Tarendeau, F., Boudet, J., Guilligay, D., Mas, P. J., Bougault, C. M., Boulo, S., Baudin, F., Ruigrok, R. W. H., Daigle, N., Ellenberg, J., Cusack, S., Simorre, J. P. & Hart, D. J. (2007).** Structure and nuclear import function of the C-terminal domain of influenza virus polymerase PB2 subunit. *Nature Structural & Molecular Biology*, 14(3), pp.229–233.

- Tarendeau, F., Crepin, T., Guilligay, D., Ruigrok, R. W. H., Cusack, S. & Hart, D. J. (2008).** Host determinant residue lysine 627 lies on the surface of a discrete, folded domain of influenza virus polymerase PB2 subunit. *PLoS Pathogens*, 4(8), p.e1000136.
- Taubenberger, J. K., Reid, A. H., Lourens, R. M., Wang, R., Jin, G. & Fanning, T. G. (2005).** Characterization of the 1918 influenza virus polymerase genes. *Nature*, 437(7060), pp.889–893.
- Taubenberger, J. K. & Morens, D. M. (2006).** 1918 Influenza: the mother of all pandemics. *Emerging Infectious Diseases*, 12, pp.15–22.
- Taubenberger, J. K. & Morens, D. M. (2010).** Influenza: the once and future pandemic. *Public Health Reports, Suppl.3*, 125, pp.16–26.
- Taubenberger, J. K. & Kash, J. C. (2010).** Influenza virus evolution, host adaptation, and pandemic formation. *Cell Host & Microbe*, 7(6), pp.440–451.
- Tong, S., Li, Y., Rivallier, P., Conrardy, C., Castillo, D. a A., Chen, L.-M., Recuenco, S., Ellison, J. A., Davis, C. T., York, I. A., Turmelle, A. S., Moran, D., Rogers, S., Shi, M., Tao, Y., Weil, M. R., Tang, K., Rowe, L. A., Sammons, S., Xu, X., Frace, M., Lindblade, K. A., Cox, N. J., Anderson, L. J., Rupprecht, C. E. & Donis, R. O. (2012).** A distinct lineage of influenza A virus from bats. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(11), pp.4269–4274.
- Tong, S., Zhu, X., Li, Y., Shi, M., Zhang, J., Bourgeois, M., Yang, H., Chen, X., Recuenco, S., Gomez, J., Chen, L. M., Johnson, A., Tao, Y., Dreyfus, C., Yu, W., McBride, R., Carney, P. J., Gilbert, A. T., Chang, J., Guo, Z., Davis, C. T., Paulson, J. C., Stevens, J., Rupprecht, C. E., Holmes, E. C., Wilson, I. A. & Donis, R. O. (2013).** New world bats harbor diverse influenza A viruses. *PLoS Pathogens*, 9(10), p.e1003657.
- Torreira, E., Schoehn, G., Fernández, Y., Jorba, N., Ruigrok, R. W. H., Cusack, S., Ortin, J. & Llorca, O. (2007).** Three-dimensional model for the isolated recombinant influenza virus polymerase heterotrimer. *Nucleic Acids Research*, 35(11), pp.3774–3783.
- Tumpey, T. M., Garcia-Sastre, A., Taubenberger, J. K., Palese, P., Swayne, D. E. & Basler, C. F. (2004).** Pathogenicity and immunogenicity of influenza viruses with genes from the 1918 pandemic virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(9), pp.3166–3171.
- Van Hoeven, N., Pappas, C., Belser, J. A., Maines, T. R., Zeng, H., García-Sastre, A., Sasisekharan, R., Katz, J. M. & Tumpey, T. M. (2009).** Human HA and polymerase subunit PB2 proteins confer transmission of an avian influenza virus through the air. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(9), pp.3366–3371.
- Van Riel, D., Munster, V. J., de Wit, E., Rimmelzwaan, G. F., Fouchier, R. a M., Osterhaus, A. D. M. E. & Kuiken, T. (2007).** Human and avian influenza viruses target different cells in the lower respiratory tract of humans and other mammals. *The American Journal of Pathology*, 171(4), pp.1215–1223.
- Wagner, R., Matrosovich, M. & Klenk, H.-D. (2002).** Functional balance between haemagglutinin and neuraminidase in influenza virus infections. *Reviews in Medical Virology*, 12(3), pp.159–166.
- Wang, L. & Lee, C.-W. (2009).** Sequencing and mutational analysis of the non-coding regions of influenza A virus. *Veterinary Microbiology*, 135(3-4), pp.239–247.
- Wanitchang, A., Kramyu, J. & Jongkaewwattana, A. (2010).** Enhancement of reverse genetics-derived swine-origin H1N1 influenza virus seed vaccine growth by inclusion of indigenous polymerase PB1 protein. *Virus Research*, 147(1), pp.145–148.

- Watanabe, T., Watanabe, S., Shinya, K., Kim, J. H., Hatta, M. & Kawaoka, Y. (2009).** Viral RNA polymerase complex promotes optimal growth of 1918 virus in the lower respiratory tract of ferrets. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(2), pp.588–592.
- Webster, R. G., Bean, W. J., Gorman, O. T., Chambers, T. M. & Kawaoka, Y. (1992).** Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 56(1), pp.152–179.
- Wendel, I. (2008).** Untersuchungen zur Wirkung von Mutationen im PB1-Protein bei der Adaptation aviärer Influenza A-Viren an den Menschen. *unpublished*
- Wise, H. M., Foeglein, A., Sun, J., Dalton, R. M., Patel, S., Howard, W., Anderson, E. C., Barclay, W. S. & Digard, P. (2009).** A complicated message: Identification of a novel PB1-related protein translated from influenza A virus segment 2 mRNA. *Journal of Virology*, 83(16), pp.8021–8031.
- Wise, H. M., Barbezange, C., Jagger, B. W., Dalton, R. M., Gog, J. R., Curran, M. D., Taubenberger, J. K., Anderson, E. C. & Digard, P. (2011).** Overlapping signals for translational regulation and packaging of influenza A virus segment 2. *Nucleic Acids Research*, 39(17), pp.7775–7790.
- Wise, H. M., Hutchinson, E. C., Jagger, B. W., Stuart, A. D., Kang, Z. H., Robb, N., Schwartzman, L. M., Kash, J. C., Fodor, E., Firth, A. E., Gog, J. R., Taubenberger, J. K. & Digard, P. (2012).** Identification of a novel splice variant form of the influenza A virus M2 ion channel with an antigenically distinct ectodomain. *PLoS Pathogens*, 8(11), p.e1002998.
- Wong, K. K. Y., Bull, R. A., Rockman, S., Scott, G., Stelzer-Braid, S. & Rawlinson, W. (2011).** Correlation of Polymerase Replication Fidelity With Genetic Evolution of Influenza A/Fujian/411/02 (H3N2) Viruses. *Journal of Medical Virology*, 83, pp.510–516.
- Worobey, M., Han, G.-Z. & Rambaut, A. (2014).** A synchronized global sweep of the internal genes of modern avian influenza virus. *Nature*.
- Xu, C., Hu, W.-B., Xu, K., He, Y.-X., Wang, T.-Y., Chen, Z., Li, T.-X., Liu, J.-H., Buchy, P. & Sun, B. (2012).** Amino acids 473V and 598P of PB1 from an avian-origin influenza A virus contribute to polymerase activity, especially in mammalian cells. *The Journal of General Virology*, 93(3), pp.531–40.
- Yamada, H., Chounan, R., Higashi, Y., Kurihara, N. & Kido, H. (2004).** Mitochondrial targeting sequence of the influenza A virus PB1-F2 protein and its function in mitochondria. *FEBS Letters*, 578(3), pp.331–336.
- York, A. & Fodor, E. (2013).** Biogenesis, assembly, and export of viral messenger ribonucleoproteins in the influenza A virus infected cell. *RNA Biology*, 10(8), pp.1274–1282.
- Yuan, P., Bartlam, M., Lou, Z., Chen, S., Zhou, J., He, X., Lv, Z., Ge, R., Li, X., Deng, T., Fodor, E., Rao, Z. & Liu, Y. (2009).** Crystal structure of an avian influenza polymerase PA(N) reveals an endonuclease active site. *Nature*, 458(7240), pp.909–913.
- Zamarin, D., García-Sastre, A., Xiao, X., Wang, R. & Palese, P. (2005).** Influenza virus PB1-F2 protein induces cell death through mitochondrial ANT3 and VDAC1. *PLoS Pathogens*, 1(1), p.e4.
- Zamarin, D., Ortigoza, M. B. & Palese, P. (2006).** Influenza A virus PB1-F2 protein contributes to viral pathogenesis in mice. *Journal of Virology*, 80(16), pp.7976–7983.
- Zell, R., Krumbholz, A., Eitner, A., Krieg, R., Halbhuber, K.-J. & Wutzler, P. (2007).** Prevalence of PB1-F2 of influenza A viruses. *The Journal of General Virology*, 88(Pt 2), pp.536–546.
- Zheng, B., Chan, K.-H., Zhang, A. J. X., Zhou, J., Chan, C. C. S., Poon, V. K. M., Zhang, K., Leung, V. H. C., Jin D. Y., Woo, P. C. Y., Chan, J. F. W., To, K. K. W., Chen, H. & Yuen, K.-Y. (2010).** D225G mutation in hemagglutinin of pandemic influenza H1N1 (2009) virus enhances virulence in mice. *Experimental Biology and Medicine*, 235(8), pp.981–988.

- Zhou, B., Li, Y., Halpin, R., Hine, E., Spiro, D. J. & Wentworth, D. E. (2011).** PB2 residue 158 is a pathogenic determinant of pandemic H1N1 and H5 influenza A viruses in mice. *Journal of Virology*, 85(1), pp.357–365.
- Zhou, N. N., Senne, D. A., Landgraf, J. S., Swenson, S. L., Erickson, G., Rossow, K., Liu, L., Yoon, K. J., Krauss, S. & Webster, R. G. (1999).** Genetic reassortment of avian, swine, and human influenza A viruses in American pigs. *Journal of Virology*, 73(10), pp.8851–8856.
- Zhu, X., Yu, W., McBride, R., Li, Y., Chen, L.-M., Donis, R. O., Tong, S., Paulson, J. C. & Wilson, L. A. (2013).** Hemagglutinin homologue from H17N10 bat influenza virus exhibits divergent receptor-binding and pH-dependent fusion activities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(4), pp.1458–1463.

VII. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abb. I.1:	Struktur des Influenza-A-Virus.....	3
Abb. I.2:	Schematische Darstellung des Replikationszyklus der Influenza-A-Viren modifiziert nach Naffakh <i>et al.</i> , 2008.....	9
Abb. I.3:	Zeitliches Auftreten und Entstehen der Influenza-Pandemien des 20./21. Jahrhunderts.....	24
Abb. I.4:	Genomische Organisation des PB1-Gensegments.....	25
Abb. I.5:	Organisation des viralen RNA-abhängigen RNA-Polymerasekomplexes.....	27
Abb. III.1:	Prinzip des Luziferase-Minigenom Assays.....	64
Abb. III.2:	Schematische Darstellung der Sequenzierung der 3'NCRs und 5'NCRs mittels 3'-RACE und 5'RACE.....	69
Abb. III.3:	Schematische Darstellung des „8-Plasmid Systems“ zur Generierung rekombinanter Influenza-A-Viren nach Hoffmann <i>et al.</i> , 2000.....	72
Abb. IV.1:	Schematische Darstellung der Entstehung der Pandemie von 1968.....	90
Abb. IV.2:	Phylogenetischer Stammbaum der konkatenierten Gensegmente PB2-PA-NP-NA-M-NS humaner H2N2 Viren, isoliert in den Jahren 1965 bis 1968 und den pandemischen HK68-Viren.....	92
Abb. IV.3:	Organisation der Pol I-Pol II-Transkriptionseinheiten im Vektor pHW2000 nach Hoffmann <i>et al.</i> , 2000.....	95
Abb. IV.4:	Wachstumsverhalten der Viruspaare PB1, HA+PB1 und HK68 in Calu-3-Zellen.....	99
Abb. IV.5:	Charakterisierung von Virusmischungen mittels Sanger-Sequenzierung.....	100
Abb. IV.6:	Kalibrierungskurve zur Ermittlung der Genauigkeit mit der anhand des mittleren Verhältnisses der Peak-Höhe für PB1 _{HK} der Anteil der Viren mit PB1 _{HK} quantifiziert werden kann.....	102
Abb. IV.7:	Ko-Infektionsstudien mit den Viruspaaren PB1 und HA+PB1 in Calu-3 Zellen.....	103
Abb. IV.8:	Kompetitive Rescue-Experimente mit den Viruspaaren PB1 und HA+PB1 in Calu-3 Zellen bei einem PB1-Plasmidverhältnis von 1:1 (PB1 _{HK} zu PB1 _{Cal}).....	105
Abb. IV.9:	Kontaktübertragungs-Studien in Meerschweinchen mit den Viren rCal-HA _{HK} und Cal-(HA+PB1) _{HK}	107
Abb. IV.10:	Kompetitive Kontaktübertragungs-Studien in Meerschweinchen mit dem Viruspaar HA+PB1.....	109
Abb. IV.11:	Sequenzvergleich der 3'NCR- und 5'NCR-Sequenzen der Wildtypisolate A/California/1/66 (H2N2) und A/Hong Kong/1/68 (H3N2) mit den in dieser Arbeit rekombinant hergestellten Viren.....	112
Abb. IV.12:	Kompetitive Rescue-Experimente in Calu-3-Zellen zur Evaluierung des Einflusses der Mutation G4 auf die virale Replikationseffizienz.....	115
Abb. IV.13:	Reassortierungs-Szenarien die zur Entstehung des pandemischen HK68-Virus geführt haben könnten.....	118

Abb. IV.14:	Phylogenetischer Stammbaum für die kodierenden PB1-Nukleotidsequenzen der pandemischen H3N2-Viren aus den Jahren 1968 und 1969, humaner H2N2-Viren aus den Jahren 1957 bis 1959 und der zum pandemischen HK68-Virus nächst-verwandten aviären Virusisolate aus Nordamerika und Australien.....	120
Abb. IV.15:	PB1-Sequenzvergleich der pandemischen H3N2-Viren mit den aviären Virusisolaten aus Nordamerika.....	122
Abb. IV.16:	Phylogenetischer Stammbaum für die kodierenden PB1-Nukleotidsequenzen der zu den pandemischen H3N2-Viren nächstverwandten Viren.....	123
Abb. IV.17:	Phylogenetischer Stammbaum und Sequenzanalyse für die von Taubenberger <i>et al.</i> , 2005 vorgeschlagene adaptive Mutation PB1-N375S.....	124
Abb. IV.18:	Kompetitive Rescue-Experimente in Calu-3-Zellen zur Evaluierung des Einflusses des nicht-adaptierten aviären PB1-Gensegments PB1 _{HK-121/212/327} auf die virale Replikationseffizienz.....	127
Abb. IV.19:	Zusammensetzung der nach drei Passagen auf Calu-3-Zellen erhaltenen kompetitiv hergestellten Virusmischungen des PB1-Paares.....	128
Abb. IV.20:	Polymerase-Aktivitäten der rekonstituierten vRNP's von Cal66 und HK68.....	130
Abb. IV.21:	Polymerase-Aktivität rekonstituierter Cal66-vRNP-Komplexe mit nicht-adaptiertem aviären PB1 _{HK-121/212/327}	131
Abb. IV.22:	Vergleich der Mutations-Frequenzen der rHK68-Einzelmutanten (rHK-PB1 _{HK-R121K} , rHK-PB1 _{HK-V212L} , rHK-PB1 _{HK-K327R}) mit dem pandemischen HK68-Virus (rHK68), sowie der initialen Reassortante (rHK-PB1 _{HK-121/212/327}).....	135
Abb. V.1:	Lokalisation der bestehenden Sequenzunterschiede und der funktionellen Domänen innerhalb des PB1- bzw. PB1-N40-Proteins und des PB1-F2-Proteins von Cal66 und HK68.....	147
Abb. V.2:	Modell zur Entstehung der Pandemie von 1968.....	158
Tab. I.1:	Taxonomie der Orthomyxoviren.....	1
Tab. I.2:	Funktionen und Eigenschaften der durch die Gensegmente kodierten Influenzaproteine.....	5
Tab. IV.1:	Anzahl der Nukleotid-/Aminosäureaustausche zwischen den Gensegmenten des pandemischen HK68-Virus und seinen phylogenetisch nächst verwandten humanen H2N2 Viren.....	93
Tab. IV.2:	Genotypen der rekombinant hergestellten A/California/1/66-Viren.....	97
Tab. IV.3:	Genotypen der rekombinant hergestellten A/Hong Kong/1/68 Viren.....	98
Tab. IV.4:	Human-adaptive Mutationen des PB1-Proteins, in denen sich die aviären PB1-Proteine der pandemischen H3N2-Isolate von denen der nächst-verwandten aviären Virusisolate unterscheiden.....	125

Tab. IV.5:	Darstellung der Aminosäure-Substitutionen zwischen den PB1-Plasmiden, die für das human-adaptierte aviäre PB1 des pandemischen HK68-Virus und das nicht-adaptierte aviäre PB1 des aviären H3-Vorläufervirus kodieren.....	125
Tab. IV.6:	Mutationsrate rekombinanter HK68-Viren mit humanem PB1 _{Cal} , nicht-adaptiertem aviärem PB1 _{HK-121/212/327} und human-adaptiertem aviärem PB1 _{HK}	133

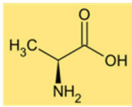
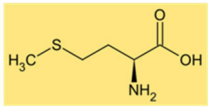
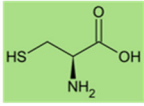
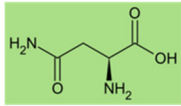
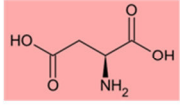
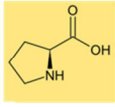
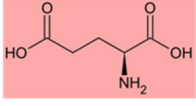
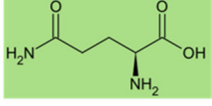
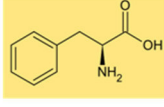
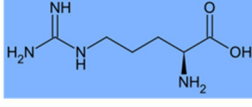
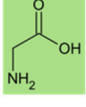
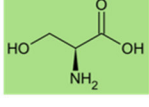
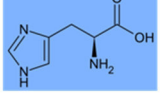
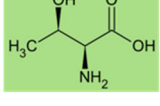
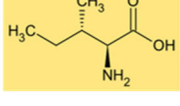
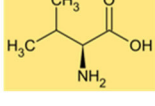
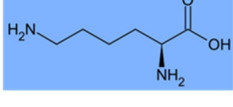
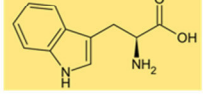
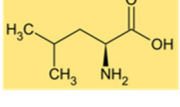
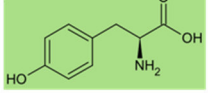
VIII. Abkürzungsverzeichnis


Abkürzung	Bedeutung
A	Adenin
Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
aa	Aminosäure (<i>amino acid</i>)
bp	Basenpaar
BSA	Bovines Serumalbumin
BSL	Biologische Sicherheitsstufe (<i>biosafety level</i>)
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
C-terminal	Carboxyterminal
cDNA	kopierte (<i>copy/complementary</i>) DNA
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CPE	zytopathischer Effekt (<i>cytopathic effect</i>)
dH ₂ O	deionisiertes Wasser
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxy-Nukleosid-5'-Triphosphat
ddNTP	Didesoxy-Nukleosid-5'-Triphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
<i>et al.</i>	und andere (lateinisch: et alteri)
FCS	Fötales Kälberserum (<i>Fetal Calf Serum</i>)
G	Guanin
g	Gramm
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
HA	Hämagglutinin
HAU	Hämagglutinationseinheit (<i>hemagglutination unit</i>)
HRP	Meerrettichperoxidase (<i>Horse Radish Peroxidase</i>)
Ig	Immunglobulin
IP	infektiöse Partikel
k	Kilo
kb	Kilobasen


l	Liter
M	Molar (mol/l)
M	Matrixprotein
m	Milli
μ	Mikro
mA	Milliampere
MDT	mittlere Todeszeit (<i>mean death time</i>)
MEM	Minimal Essential Medium
min	Minute
Mock	Negativkontrolle, Blindwert
MOI	Multiplizität der Infektion (<i>multiplicity of infection</i>)
mRNA	Boten-RNA (<i>messenger RNA</i>)
MTS	Mitochondriales Targeting Signal (<i>mitochondrial targeting signal</i>)
n	Nano
N-terminal	Aminoterminal
NA	Neuraminidase
NCR	Nicht-kodierende Region (<i>non-coding region</i>)
NLS	Kernlokalisationssignal (<i>nuclear localisation signal</i>)
nm	Nanometer
NP	Nukleoprotein
NS	Nichtstrukturprotein
nt	Nukleotid
OD _λ	optische Dichte bei einer Wellenlänge λ
ORF	offener Leserahmen (<i>open reading frame</i>)
p	Piko
PA	Polymeraseprotein, azidisch
PB1	Polymeraseprotein, basisch 1
PB2	Polymeraseprotein, basisch 2
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PFU	Plaque-bildende Einheiten (<i>plaque forming units</i>)
p.i.	nach Infektion (<i>post infection</i>)
p.i.	nach Inokulation (<i>post inoculation</i>)
Pol	Polymerase
poly(A)-	Polyadenylierungs-
rER	raues Endoplasmatisches Retikulum
RACE	<i>Rapid Amplification of cDNA Ends</i>


RLU	<i>Relative Light Units</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNP	Ribonukleoproteinkomplex
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rotations per minute</i>)
RT	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkription
sec	Sekunde
sog.	sogenanntes
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TBE	Tris/Borsäure/EDTA-Puffer
TGN	Trans-Golgi-Netzwerk
TPCK	L-(Tosylamido-2-phenyl)-ethyl-chloromethyl-ke-ton
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-Aminomethan
U	Enzymeinheit
Ü.N.	über Nacht
∞	unendlich
UV	Ultraviolett
V	Volt
vRNA	virale Ribonukleinsäure
vRNP	viraler Ribonukleoproteinkomplex
WHO	Weltgesundheitsorgansation (<i>World Health Organisation</i>)
WT	Wildtyp


Abkürzungen der Aminosäuren im Ein- und Drei-Buchstaben-Code

A	Ala	Alanin		M	Met	Methionin	
C	Cys	Cystein		N	Asp	Asparagin	
D	Asp	Aspartat		P	Pro	Prolin	
E	Glu	Glutamat		Q	Gln	Glutamin	
F	Phe	Phenylalanin		R	Arg	Arginin	
G	Gly	Glycin		S	Ser	Serin	
H	His	Histidin		T	Thr	Threonin	
I	Ile	Isoleucin		V	Val	Valin	
K	Lys	Lysin		W	Trp	Tryptophan	
L	Leu	Leucin		Y	Tyr	Tyrosin	

 unpolar/hydrophob

 polar/neutral

 basisch

 sauer

Quelle Strukturformeln der Aminosäuren: www.wikipedia.de (abgerufen am 24.07.2014)

IX. Anhang

Anhang A1: Rohdaten der kompetitiven Replikations- und Kontaktübertragungs-Studien

Die im Rahmen der Charakterisierung von Virusmischungen (IV.3.2) ermittelten mittleren Verhältnisse der Peak-Höhe für PB1_{HK} ($h_{HK68}/[h_{HK68}+h_{Cal66}]$) wurden zur besseren Übersichtlichkeit farblich unterlegt: **Rot:** 1,0 – 0,9; **Hellrot:** 0,89 – 0,67; **Grau:** 0,66 – 0,34; **Hellgrün:** 0,33 – 0,11; **Grün:** 0,1 – 0. Entsprechend der Formel zur Berechnung des mittleren Verhältnisses der Peak-Höhe für PB1_{HK} gilt: Je höher das Verhältnis der mittleren Peak-Höhe für PB1_{HK}, desto mehr Viren mit PB1_{HK} sind in den Virusmischungen enthalten.

Zu Abb. IV.7: Koinfektions-Studien mit den Viruspaaren PB1 und HA+PB1 in Calu-3 Zellen

Viruspaar	Experiment-Virusstock	Replikat Nummer	Mittleres Verhältnis der Peak-Höhe für PB1 _{HK}
PB1	I-1	initial_mix	0,44
	II-1	initial_mix	0,44
	II-2	initial_mix	0,48
	I-1	1	0,43
		2	0,71
		3	1,00
		4	0,00
		5	0,43
		6	0,76
		7	0,73
		8	1,00
	II-1	1	1,00
		2	0,99
		3	0,03
		4	0,79
		5	0,59
		6	0,63
		7	0,94
		8	0,78
	II-2	1	0,80
		2	0,68
		3	0,79
		4	0,83
		5	0,90
		6	0,90
		7	0,96
		8	0,74

Viruspaar	Experiment-Virusstock	Replikat Nummer	Mittleres Verhältnis der Peak-Höhe für PB1 _{HK}
HA+PB1	I-1	initial_mix	0,51
	II-1	initial_mix	0,47
	II-2	initial_mix	0,50
	I-1	1	0,46
		2	0,95
		3	0,98
		4	0,88
		5	0,95
		6	1,00
		7	0,89
		8	0,86
	II-1	1	0,90
		2	0,94
		3	0,90
		4	0,84
		5	0,96
		6	0,86
		7	0,81
		8	0,96
	II-2	1	0,95
		2	0,94
		3	0,75
		4	0,72
		5	0,80
		6	0,75
		7	0,77
		8	0,94

Zu Abb. IV.8: Kompetitive Rescue-Experimente mit den Viruspaaren PB1 und HA+PB1 in Calu-3 Zellen bei einem PB1-Plasmidverhältnis von 1:1 (PB1_{HK} zu PB1_{Cal})

Viruspaar	Experiment-Plasmidstock	Replikat Nummer	Mittleres Verhältnis der Peak-Höhe für PB1 _{HK}
PB1	I-1	1	0,84
		2	0,90
		3	1,00
		4	0,99
	I-2	1	0,86
		2	0,92
		3	1,00
		4	1,00
	II-1	1	1,00
		2	0,80
		3	1,00
		4	1,00
	II-2	1	0,98
		2	1,00
		3	0,91
		4	0,85
	II-3	1	0,91
		2	1,00
		3	0,93
		4	0,90

Viruspaar	Experiment-Plasmidstock	Replikat Nummer	Mittleres Verhältnis der Peak-Höhe für PB1 _{HK}
HA+PB1	I-1	1	0,97
		2	0,99
		3	1,00
		4	1,00
	I-2	1	0,99
		2	0,93
		3	0,86
		4	0,99
	II-1	1	0,98
		2	0,97
		3	0,87
		4	0,96
	II-2	1	1,00
		2	1,00
		3	1,00
		4	0,73
	II-3	1	0,99
		2	1,00
		3	0,99
		4	1,00

Zu Abb. IV.10: Kompetitive Kontaktübertragungs-Studien in Meerschweinchen mit dem Viruspaar HA+PB1

1. Experiment

Viruspaar	Experiment-Virusstock	Art der Infektion des Versuchstieres	Replikat Nummer	Mittleres Verhältnis der Peak-Höhe für PB1 _{HK}
HA+PB1	I-1	-	Initial mix	0,45
		inokuliert	1	0,53
			2	0,48
			3	0,43
			4	0,57
		kontakt	1	1,00
			2	0,89
			3	0,91
			4	0,29

2. Experiment

Viruspaar	Experiment-Virusstock	Art der Infektion des Versuchstieres	Replikat Nummer	Mittleres Verhältnis der Peak-Höhe für PB1 _{HK}
HA+PB1	II-1	-	Initial mix	0,43
		inokuliert	1	0,62
			2	0,62
			3	0,60
			4	0,66
		kontakt	1	1,00
			2	0,58
			3	1,00
			4	1,00

Zu Abb. IV.12: Kompetitive Rescue-Experimente in Calu-3-Zellen zur Evaluierung des Einflusses der Mutation G4 auf die virale Replikationseffizienz

Viruspaar	Nukleotid an Pos. 4 im 3'NCR des PB1 _{Cal} -Plasmids	Experiment-Plasmidstock	Replikat Nummer	Mittleres Verhältnis der Peak-Höhe für PB1 _{HK}
PB1	G	I-1	1	0,98
			2	1,00
			3	0,91
			4	0,85
		I-2	1	0,91
			2	1,00
			3	0,93
			4	0,90
	A	I-1	1	0,85
			2	0,97
			3	0,96
			4	0,95
		I-2	1	0,84
			2	0,98
			3	0,99
			4	0,59

Viruspaar	Nukleotid an Pos. 4 im 3'NCR des PB1 _{Cal} -Plasmids	Experiment-Plasmidstock	Replikat Nummer	Mittleres Verhältnis der Peak-Höhe für PB1 _{HK}
HA+PB1	G	I-1	1	1,00
			2	1,00
			3	1,00
			4	0,73
		I-2	1	0,99
			2	1,00
			3	0,99
			4	1,00
	A	I-1	1	0,97
			2	1,00
			3	0,99
			4	0,99
		I-2	1	1,00
			2	0,82
			3	1,00
			4	0,97

Zu Abb. IV.18: Kompetitive Rescue-Experimente in Calu-3-Zellen zur Evaluierung des Einflusses des nicht-adaptierten aviären PB1-Gensegments PB1_{HK-121/212/327} auf die virale Replikationseffizienz

Viruspaar	Genotyp des aviären PB1-Gens	Nukleotid an Pos. 4 im 3'NCR des PB1 _{Cal} ⁺ Plasmids	Experiment-Plasmidstock	Replikat Nummer	Mittleres Verhältnis der Peak-Höhe für PB1 _{HK}
PB1	PB1 _{HK-121/212/327}	A	I-1	1	0,00
				2	0,95
				3	0,53
				4	0,95
			I-2	1	0,55
				2	0,54
				3	0,53
				4	0,57
		G	I-1	1	0,56
				2	0,57
				3	0,55
				4	0,00
			I-2	1	0,56
				2	0,80
				3	0,94
				4	0,96
	PB1 _{HK}	A	I-1	1	0,54
				2	0,94
				3	0,96
				4	0,52
			I-2	1	0,96
				2	0,56
				3	0,94
				4	0,60
		G	I-1	1	0,93
				2	0,58
				3	0,95
				4	0,93
			I-2	1	0,95
				2	0,93
				3	0,56
				4	0,55

Viruspaar	Genotyp des aviären PB1-Gens	Nukleotid an Pos. 4 im 3'NCR des PB1 _{Cal} ⁺ Plasmids	Experiment-Plasmidstock	Replikat Nummer	Mittleres Verhältnis der Peak-Höhe für PB1 _{HK}
HA+PB1	PB1 _{HK-121/212/327}	A	I-1	1	0,53
				2	0,51
				3	0,52
				4	0,91
			I-2	1	0,54
				2	0,54
				3	0,93
				4	0,92
		G	I-1	1	0,85
				2	0,92
				3	0,54
				4	0,69
			I-2	1	0,91
				2	0,51
				3	0,52
				4	0,52
	PB1 _{HK}	A	I-1	1	0,93
				2	0,51
			I-2	3	0,94
				4	0,94
		G	I-1	1	0,95
				2	0,50
			I-2	3	0,51
				4	0,93
	PB1 _{HK}	A	I-1	1	0,93
				2	0,93
			I-2	3	0,93
				4	0,55
		G	I-1	1	0,96
				2	0,66
			I-2	3	0,52
				4	0,91

Zu Abb. IV.19: Zusammensetzung der erhaltenen kompetitiv hergestellten Virusmischungen des PB1-Paares nach dreimaligem Passagieren auf Calu-3-Zellen

Viruspaar	Genotyp des aviären PB1-Gens	Nukleotid an Pos. 4 im 3'NCR des PB1 _{Cal} -Plasmids	Experiment-Plasmidstock	Replikant Nummer	Mittleres Verhältnis der Peak-Höhe für PB1 _{HK} nach ...	
					Passage 1	Passage 3
PB1	PB1 _{HK-121/212/327}	A	I-1	1	0,00	0,00
				2	0,95	1,00
				3	0,53	0,80
				4	0,95	1,00
			I-2	1	0,55	1,00
				2	0,54	0,85
				3	0,53	0,83
				4	0,57	0,43
		G	I-1	1	0,56	0,62
				2	0,57	0,87
				3	0,55	0,97
				4	0,00	0,00
			I-2	1	0,56	0,00
				2	0,80	0,85
				3	0,94	1,00
				4	0,96	1,00
	PB1 _{HK}	A	I-1	1	0,54	1,00
				2	0,94	1,00
				3	0,96	1,00
				4	0,52	1,00
			I-2	1	0,96	1,00
				2	0,56	1,00
				3	0,94	1,00
				4	0,60	0,88
		G	I-1	1	0,93	0,97
				2	0,58	0,49
				3	0,95	1,00
				4	0,93	1,00
			I-2	1	0,95	1,00
				2	0,93	1,00
				3	0,56	1,00
				4	0,55	1,00

Veröffentlichungen

Wendel I., Rubbenstroth D., Uhlenhorff, J., Kochs G., Wilhelm, J., Stäheli P., Klenk H.-D., Matrosovich M. (2014). „The avian-origin PB1 gene segment facilitated replication and transmissibility of the H3N2/1968 pandemic influenza virus.”

Nature Communications (in Vorbereitung)

Vorträge

Wendel I., Rubbenstroth D., Stäheli P., Kochs G., Stapleford K., Vignuzzi M., Klenk H.-D., Matrosovich M. (2014). „The role of the avian-origin PB1 gene segment in the emergence of the H3N2/1968 pandemic influenza virus.”

EU Predemics WP3 Workshop, 6.-7. Februar 2014 in Rom, Italien

Wendel I., Rubbenstroth D., Stäheli P., Klenk H.-D., Matrosovich M. (2012). „The avian-like PB1 gene of the 1968 pandemic influenza virus facilitates viral replication and transmission.”

3rd International Influenza Meeting, 02.-04. September 2012 in Münster, Deutschland

Wendel I., Rubbenstroth D., Stäheli P., Klenk H.-D., Matrosovich M. (2012). „The role of the avian-like PB1 gene in the emergence of the 1968 pandemic influenza virus.”

22nd Annual Meeting of the German Society of Virology, 14.-17. März 2012 in Essen, Deutschland

Wendel I., Uhlenhorff J., Klenk H.-D., Matrosovich M. (2011). „The role of the PB1 gene in the emergence of pandemic influenza viruses as analyzed by reverse genetics.”

Young Scientist Workshop “Methods to study influenza virus”, 20.-23. September 2011 in Berlin, Deutschland

Posterpräsentationen

Wendel I., Rubbenstroth D., Kochs G., Stäheli P., Klenk H.-D., Matrosovich M. (2013). „The avian-like PB1 gene of the 1968 pandemic influenza virus enhances viral replication and transmission.”

Options for the Control of Influenza VIII, 05.-10. September 2013 in Kapstadt, Südafrika

Wendel I., Uhendorff J., Klenk H.-D., Matrosovich M. (2011). „The avian-like PB1 gene of the 1968 pandemic influenza virus facilitates viral replication.”

21st Annual Meeting of the German Society of Virology, 23.-26. März 2011 in Freiburg, Deutschland

Wendel I., Uhendorff J., Klenk H.-D., Matrosovich M. (2009). „Substitutions in the PB1 gene of the 1968 pandemic influenza virus enhanced transcription efficiency in human cells.”

Internationales Symposium des DFG Sonderforschungsbereichs 593, 24.-25. September 2009 in Marburg, Deutschland

Wendel I., Uhendorff J., Klenk H.-D., Matrosovich M. (2009). „Substitutions in the PB1 gene of the 1968 pandemic influenza virus enhanced transcription efficiency in human cells.”

5th Orthomyxovirus Research Conference, 09.-12. September 2009 in Freiburg, Deutschland

Wendel I., Uhendorff J., Klenk H.-D., Matrosovich M. (2009). „Adaptive changes in the PB1 gene during the emergence of the 1968 pandemic influenza virus.”

19th Annual Meeting of the German Society of Virology, 18.-21. März 2009 in Leipzig, Deutschland

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Mikhail Matrosovich und Dr. Tatyana Matrosovich für die Möglichkeit meine Promotion in ihrer Arbeitsgruppe anfertigen zu können, die Überlassung des überaus ergiebigen und spannenden Dissertationsthemas, die immerwährende wissenschaftliche Unterstützung die mir während meiner gesamten Promotion zu Teil wurde, die stete Diskussionsbereitschaft und die Ermöglichung der zahlreichen Konferenzbesuche zum wissenschaftlichen Austausch.

Herrn Prof. Dr. Hans-Dieter Klenk danke ich herzlich für die vielen Anregungen und die stete Diskussionsbereitschaft in den Freitags-Seminaren, sowie für die Erstellung des Zweitgutachtens.

Herrn Prof. Dr. Erhard Bremer danke ich vielmals für die Betreuung und Vertretung meiner Doktorarbeit am Fachbereich Biologie, sowie für die Erstellung des Erstgutachtens. Ebenso danke ich Herrn Prof. Dr. Wolfgang Buckel und Frau Prof. Dr. Susanne Önel für die Bereitschaft als Kommissionsmitglieder im vorliegenden Promotionsprüfungsverfahren zur Verfügung zu stehen.

Dem LOEWE Zentrum Universities of Gießen and Marburg Lung Center (UGMLC) „Entzündliche und hyperproliferative Erkrankungen der Lunge und der Atemwege“, sowie den EU getragenen FP6- und FP7-Forschungsprojekten FLUPATH „Avian influenza: impact of virus-host interactions on pathogenesis and ecology“ und PREDEMICS „Preparedness, Prediction and Prevention of Emerging Zoonotic Viruses with Pandemic Potential“ danke ich für die finanzielle Unterstützung während meiner Dissertation.

Meinen Kooperationspartnern Prof. Dr. Peter Stäheli, Dr. Dennis Rubbenstroth, Prof. Dr. Georg Kochs, Dr. Marco Vignuzzi und Dr. Kenneth Stapleford danke ich für die überaus produktive und erfolgreiche Zusammenarbeit in verschiedenen, in der Arbeit näher benannten Kooperationsprojekten. Ein besonderer Dank gilt an dieser Stelle Herrn Dr. Jochen Müller ohne dessen Hilfe die statistischen Auswertungen in der vorliegenden Form sicherlich nicht möglich gewesen wären. Ihm danke ich ebenfalls für die endlose Geduld mit der er mir die Welt der Statistik zumindest ein kleines bisschen näher gebracht hat.

Herrn Dr. Markus Eickmann und den BSL-4-Technikern Gotthard Ludwig und Michael Schmidt danke ich für die technische Unterstützung bei den Arbeiten im BSL-3-Labor.

Besonders herzlich danke ich meinen beiden ehemaligen Betreuerinnen Dr. Gülsah Gabriel und Dr. Jennifer Uhlendorff.

Gülsah danke ich für die Betreuung meiner ersten „Gehversuche“ in einem virologischen Labor. Sie hat mit ihrer herzlichen, freundlichen, motivierenden und begeisternden Art mein Interesse und meine Begeisterung für die Influenza-Forschung, insbesondere die Erforschung des Influenza-Polymerasekomplexes geweckt. Liebe Gülsah, ich danke Dir herzlichst für Deinen steten Einsatz, die tolle Zeit die ich bei Dir im Labor verbringen durfte und die vielen schönen Treffen auf Konferenzen, wo auch immer sie in der Welt stattgefunden haben.

Jenni danke ich für die Bereitstellung meines Diplomarbeitsthemas das letztlich in dem Thema meiner Doktorarbeit mündete, die großartige Betreuung während meiner Diplomarbeit, die fachliche Unterstützung während meiner Doktorarbeit, die Einarbeitung ins BSL-3-Labor und das eine oder andere gemütliche Gläschen Wein nach Feierabend.

Mein herzlicher Dank gilt ebenfalls allen jetzigen und ehemaligen Kollegen der Arbeitsgruppe Matrosovich. Besonders danke ich an dieser Stelle Jan Baumann, Thomas Gerlach und Dr. Volker Czudai-Matwich, die es immer verstanden für gute Stimmung im Labor zu sorgen und die mir stets mit Rat und Tat zur Seite standen. Vielen lieben Dank Euch Dreien dafür, sowie ein herzliches Dankeschön für viele schöne gemeinsam besuchte Konferenzen und das Korrekturlesen meiner Arbeit.

Meinen Praktikanten Johanna Ungefähr, Michael Weis und Sandro Halwe danke ich für die Mitarbeit an meinem Thema im Rahmen ihrer Praktika. Ihr habt mir nicht nur in den jeweiligen Versuchen weitergeholfen, sondern habt mir auch gezeigt, dass mir die Betreuung und Ausarbeitung kleinerer Projekte viel Spaß bereitet.

Ein besonderes Dankeschön gilt meiner lieben Kollegin Tanja Freitag für die vielen leckeren Mittagessen außerhalb der Mensa, die regelmäßigen Exkursionen zum Schokimat, das stets offene Ohr und die regelmäßigen „Physikum-Sessions“, die mich den ein oder anderen misslungenen Versuch ganz schnell wieder vergessen ließen. Meinen Freunden Lis, Karl, Steffi, Sybille, Stephi, „den Odenwäldern“ sowie „meinen Tauchern“ danke ich für den Zuspruch und die vielen schönen Unternehmungen außerhalb des Labors, die die letzten Jahre zu einer tollen Zeit gemacht haben.

Allen Kollegen des Instituts für Virologie danke ich für die sehr angenehme Arbeitsatmosphäre, die stete Hilfsbereitschaft bei allen erdenklichen Fragen und Problemen des Laboralltags und die konstruktiven Ratschläge und Anmerkungen bei den regelmäßigen Seminarvorträgen. Vielen lieben Dank auch für viele schöne Institutsfeiern und -ausflüge!

Mein allergrößter Dank gilt jedoch meiner Familie – meinen Eltern Hannelore und Günther, sowie meinen beiden Brüdern Tobias und Adrian. Ihr habt mir nicht nur finanziell sehr vieles ermöglicht, sondern wart vor allem in allen erdenklichen Lebenslagen stets für mich da, habt mich fortwährend unterstützt, ermutigt und stets fest an mich geglaubt. Dafür danke ich Euch von ganzem Herzen!

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die dem Fachbereich Biologie eingereichte Dissertation mit dem Titel:

„Die Rolle des aviären PB1 Gens bei der Entstehung pandemischer Influenza-A-Viren“

selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg, den _____

Isabel Wendel